

Physikalisch-chemische Untersuchungen
zu dem Phänomen der Oligodynamie
unter Berücksichtigung von antibakteriellen
Effekten und Gewebeverträglichkeit

Diss. Erlangen
1903

von
Petra Schuster
aus
Bayreuth





Digitized by the Internet Archive
in 2026

Physikalisch-chemische Untersuchungen
zu dem Phänomen der Oligodynamie
unter Berücksichtigung von antibakteriellen
Effekten und Gewebeverträglichkeit

Den Naturwissenschaftlichen Fakultäten
der Friedrich-Alexander-Universität Erlangen-Nürnberg

zur

Erlangung des Doktorgrades

vorgelegt

von

Petra Schuster

aus

Bayreuth

Als Dissertation genehmigt von den Naturwissenschaft-
lichen Fakultäten der Universität Erlangen-Nürnberg

Tag der mündlichen Prüfung: 10.1.1983

Vorsitzender der Promotionskommission:

Professor Dr. K. Jacobs

Erstberichterstatte: Professor Dr. M. Schaldach

Zweitberichterstatte: Professor Dr. Dr. W. Gräf

Drittberichterstatte: Professor Dr. G. Ritter

INHALT

1.	E I N L E I T U N G	- 3 -
2.	G R U N D L A G E N	- 7 -
2.1	BIOLOGISCHE GRUNDLAGEN	- 7 -
2.1.1	Wachstumsverlauf und Metabolismus	- 8 -
2.1.2	Kinetisches Modell zur Bestimmung der Wachstums- bzw. Absterbegeschwindigkeit von Zellen	- 12 -
2.2	PHYSIKALISCHE GRUNDLAGEN	- 16 -
2.2.1	Thermodynamik elektrochemischer Potentiale	- 16 -
2.2.1.1	Chemisches Potential	- 17 -
2.2.1.2	Elektrochemisches Potential	- 19 -
2.2.1.3	Phasengrenze Metall-Substrat	- 21 -
2.2.1.4	Membranpotential	- 22 -
2.2.2	Thermodynamisches Phasengleichgewicht	- 26 -
3.	M A T E R I A L U N D M E T H O D E N	- 30 -
3.1	BAKTERIEN- UND ZELLKULTUREN	- 30 -
3.1.1	Bakterien	- 30 -
3.1.2	Fibroblastenkulturen	- 31 -
3.2	VERWENDETE METALLE	- 33 -
3.3	MESSMETHODEN	- 35 -
3.3.1	Wachstumsbestimmung	- 35 -
3.3.1.1	Qualitative und quantitative Bestimmung der Hemmung	- 36 -
3.3.1.2	Photometrische Wachstumsbestimmung	- 40 -
3.3.1.3	Messung an Gewebekulturen	- 47 -
3.3.2	Einfluß metallischer Oberflächen auf das Wachstum der Bakterien	- 50 -



3.3.3	Löslichkeit von Metallen	- 53 -
3.3.3.1	Potentiometrische Konzentrationsbestimmung	- 53 -
3.3.3.2	pH-Wert-Abhängigkeit von Stoffwechsel und Metallionenkonzentrationen	- 55 -
3.3.3.3	Spektroskopische Konzentrationsbestimmung	- 56 -
3.3.4	NMR - spektroskopische Strukturanalyse	- 58 -
3.3.4.1	NMR - Apparatur	- 58 -
3.3.4.2	Chemische Verschiebung	- 60 -
4.	M E T A L L - P R O T E I N - K O M P L E X	- 63 -
4.1	PROTEINAFFINITÄT DER METALLE	- 64 -
4.2	KOMPLEXSTABILITÄT PROTEIN - METALL	- 73 -
5.	M E S S E R G E B N I S S E	- 80 -
5.1	Auswertung der Wachstumskurven und Definition eines Hemmungsmaßes	- 80 -
5.2	Wachstumskinetik und -dynamik von Fibroblasten	- 90 -
5.3	Experimentelle Überprüfung des Einflusses metallischer Oberflächen auf die Wachstumskinetik	- 96 -
5.4	Konzentrationsbestimmung mittels Potentialmessung	- 97 -
5.5	Wechselwirkung zwischen pH-Wert, Metabolismus und Metallionenkonzentration	- 103 -
5.6	Atomabsorptionsspektroskopische Messung	- 109 -
5.7	NMR-spektroskopische Analyse des Metall-Protein-Komplexes	- 109 -
6.	D I S K U S S I O N DER MESSERGEBNISSE	- 112 -
7.	Z U S A M M E N F A S S U N G	- 117 -
8.	L I T E R A T U R	- 121 -

1. Einleitung

Die antimikrobielle Wirkung verschiedener Metalle ist seit jeher in Medizin und Hygiene bekannt. Systematisch untersucht und unter dem Begriff Oligodynamie zusammengefaßt wurden diese antibakteriellen Effekte erstmals im Jahre 1893 von C. von Nägeli.

Bereits im Altertum ist die antibakterielle Wirkung von Silber und Kupfer mehr oder weniger unbewußt ausgenutzt worden, z.B. zur Wundbehandlung mit metallischen Salben. Im 18. Jahrhundert entdeckte man die antiseptische Wirkung von Metallverbindungen. 1890 beobachtete Miller die antimikrobielle Wirkung metallischer Zahnfüllungsmaterialien. Später hat Kupfer als Kupfersulfat zur Bekämpfung von Algen und neben Silber in der Aufbereitung von Flüssigkeiten (Katadynkontaktverfahren) Bedeutung erlangt (Zimmermann, 1953; Gutschmidt, 1935; Hoffmann, 1938; Lautenschläger et al, 1954; Schmidt et al, 1968).

Besonders ausgeprägt ist die antimikrobielle Wirkung außerdem noch bei Cadmium und Quecksilber und einigen Legierungen wie Messing und Amalgan. Nach bisherigen Vorstellungen nimmt die oligodynamische Wirkung in folgender Reihenfolge ab (Wallhäußer et al, 1967):

Cd > Ag > Messing > Cu > Hg

Der Wirkungsmechanismus der Oligodynamie selbst ist noch nicht restlos aufgeklärt. Vieles deutet darauf hin, daß Metallionen lebenswichtige Fermente blockieren, indem sie sich vor allem an Sulfhydrylgruppen aber auch an Carboxylgruppen anlagern und dadurch den normalen Ablauf des Stoffwechsels verhindern. Die Funktion der energieliefernden Fermentations- und Atmungsketten hängt im Wesentlichen ab von der Aktivität ihrer organischen SH-Gruppen. Deren Blockierung leitet den Zusammenbruch des Energiestoffwechsels ein (Woratz et al, 1955; Zimmermann, 1952).

Besonderes Interesse findet die Oligodynamie in neuester Zeit wegen der verstärkt auftretenden Probleme des infektiösen Hospitalismus bei der Suche nach keimwidrigen Materialien. Daneben ist die Kenntnis der oligodynamischen Wirkungsmechanismen wichtig bei der Auswahl geeigneter Werkstoffe für chirurgische Instrumente und Implantate. Metallimplantate werden in der Frakturbehandlung für Knochendrähte und Marknagelungen sowie als Platten und Schrauben bei der funktionsstabilen Osteosynthese, daneben aber auch zum Gelenk- und zum temporären Unterkieferersatz verwandt.

Eine große Bedeutung kommt dem oligodynamischen Effekt zu bei offenen, die Epitheldecke durchbrechenden Implantaten, die als Retentionselemente für Zahnersatz dienen (Krüger et al, 1979). Derartige Implantate bestehen aus einem Verankerungsteil, der im Bereich des Alveolarfortsatzes subperiostal oder intraossär eingelagert wird, und Pfeilern, die die Mundschleimhaut durchbohren und als Halteelemente für eine herausnehmbare Prothese oder einen festen Zahnersatz dienen. Bei diesen offenen Implantaten kann nach Einpflanzung im Bereich der Pfeiler eine Wundheilung nicht erfolgen, d.h. die Wunden werden künstlich offengehalten. Der als Optimum angestrebte Zustand ist eine bindegewebige Einscheidung der Pfeiler mit Ausbildung eines Epithelkragens, wozu eine ausgezeichnete Gewebeverträglichkeit des Metalls erforderlich ist. Entzündliche Veränderungen lassen sich an diesen Stellen auch bei sorgfältigster Mundpflege nicht gänzlich vermeiden, da der Epitheldurchbruch im Bereich der Pfeiler sowohl Eintrittspforte für Bakterien ist, als auch gleichzeitig entzündlichem Sekret Abfluß bietet. Ein derart chronisch infizierter Fremdkörper wie ein Pfeiler kann eine permanente Bakteriämie unterhalten. Um diese zu vermeiden, wird an das Metallimplantat neben der Gewebeverträglichkeit die zusätzliche Forderung antimikrobieller Wirksamkeit gestellt.

Demnach ist die Zielrichtung der Nutzung der Oligodynamie

in der Medizin bei Bakterien und Zellen genau entgegengesetzt. Hinsichtlich Bakterien ist eine stark hemmende, d.h. antimikrobielle Wirkung des Materials erwünscht, da es zur Keimtötung bzw. Hemmung verwandt werden soll. Medizinische Werkstoffe hingegen sollten möglichst gewebeverträgliche Eigenschaften aufweisen. Die zytotoxische Wirkung eines ungeeigneten Materials z.B. Kupfer ist aus Abb. 1.1 ersichtlich.



Abb. 1.1 Toxische Wirkung eines Metalls in Kontakt mit einer Fibroblastenkultur. Rechts im Bild befindet sich metallisches Kupfer, in unmittelbarer Nähe, abgerundete und damit tote Fibroblastenzellen. Im weiteren Einwirkungsbereich ist die Beeinträchtigung der Zellkultur an einer beginnenden Veränderung der spindelförmigen Morphologie der Zellen erkennbar. Am äußeren linken Bildrand sind noch normale, ungeschädigte Fibroblasten.

In der Umgebung des Metalls sind sämtliche Zellen abgestorben, was an ihrer veränderten Morphologie und der Ablösung vom Boden des Kulturgefäßes deutlich erkennbar ist.

Eine erfolgreiche systematische Anwendung der Oligodynamie

bei der Bekämpfung von Mikroorganismen und der Entwicklung gewebeverträglicher Implantatwerkstoffe setzt die Erforschung der antibakteriellen Wirkungsmechanismen voraus.

Hierzu ist eine genaue Analyse der Wechselwirkung zwischen Zellen und Material notwendig, d.h. die phänomenologischen Effekte müssen genau untersucht werden. Zur quantitativen Erfassung der Gewebeverträglichkeit bzw. stoffwechselhemmenden bzw. abtötenden Wirkung des Metalls ist die Definition eines Maßes erforderlich, das bei den unterschiedlichsten Versuchsbedingungen anwendbar ist und exakte, reproduzierbare Vergleichswerte liefert. Dabei stellt sich die Aufgabe, neben der Verbesserung der bekannten, teilweise unzulänglichen Meßverfahren, ein kinetisches Modell für das Wachstum von Bakterien und Gewebezellen zu entwickeln, das für die Beschreibung der oligodynamischen Wirkung der Metalle geeignet ist. Inwieweit für Bakterien und Gewebezellen dieselbe Beschreibung anwendbar ist, muß experimentell analysiert werden.

Über die phänomenologische Untersuchung hinaus verfolgt die vorliegende Arbeit das Ziel, die oligodynamischen Wirkungsmechanismen, die bisher weitgehend unbekannt sind, unter physikalisch-chemischen Aspekten zu analysieren und für die medizinische Nutzung quantifizierbar zu machen.

Hierzu ist es erforderlich, die komplexen physikalisch-biochemischen Prozesse des Wechselwirkungssystems, bestehend aus Organismus, Nährmedium und Metall, zu untersuchen. Die Lösung des Problems gliedert sich auf in die Entwicklung von Modellvorstellungen und deren experimentelle Überprüfung.

Wegen der besonderen Eignung und im Sinne einer möglichst einheitlichen und überschaubaren Darstellung der ineinandergreifenden Teilaspekte der ablaufenden Prozesse wird zu deren Beschreibung, soweit als möglich, der Formalismus der Thermodynamik benutzt.

2. Grundlagen

Die Voraussetzung für das Verständnis der Oligodynamie ist die Kenntnis des zellulären Metabolismus, insbesondere der Gesetzmäßigkeiten physikalischer, chemischer sowie biochemischer Prozesse und Reaktionen, über die die Metalle in die verschiedenen Stoffwechselabläufe blockierend eingreifen. Die phänomenologische Analyse der Oligodynamie setzt voraus, daß die normalen Lebensfunktionen bekannt und damit Abweichungen hiervon erfaßbar sind.

2.1 Biologische Grundlagen

Der Metabolismus der Zelle ist verantwortlich für die Aufrechterhaltung all ihrer Lebensfunktionen. Dazu gehören primär die Energielieferung für die intrazellulär ablaufenden biochemischen Reaktionen sowie die Synthese der einzelnen makromolekularen Zellbestandteile (wie z.B. Chromosomen, Proteine, Enzyme, Membranen, Zellwände, Geißeln). Der Aufbau der Makromoleküle erfolgt aus einfacheren organischen Grundbausteinen, wie z.B. Proteine aus Aminosäuren, Nukleinsäuren aus Nucleotiden, Polisaccharide aus einfachen Zuckern, sowie Lipide aus Glycerin und Fettsäuren wie z.B. Cholin (Thimann, 1964; Wiesmann, 1978; Jacherts, 1964). Der Metabolismus umfaßt darüberhinaus den Abbau (katabole Prozesse) zahlreicher organischer Stoffe, wobei Energie und zentrale Stoffwechsel-Intermediärprodukte gewonnen werden. Diese Intermediärprodukte, wie Brenztraubensäure, Zuckerphosphate, Acetat, Oxalacetat usw. werden mit der gewonnenen Energie zur Biosynthese (anabole Prozesse) von Zellbausteinen, wie Aminosäuren, organische Säuren (z.B. Milchsäure, Essigsäure, Ameisensäure) Polyalkohole, Amine verwendet (Otte et al, 1978).

Sowohl für den Metabolismus als auch für den Aufbau von Zellbestandteilen sind Enzyme von tragender Bedeutung. Zahlrei-

che dieser Enzyme enthalten freie SH-Gruppen, wie z.B. die Aminosäure Cystein, deren Funktionalität für die Wirkung des Enzyms notwendig ist. Die Wirksamkeit dieser Enzyme umfaßt ein weites Spektrum, vor allem zahlreiche Dehydrogenasen, Transaminasen und Hydrolasen. Bei einzelnen Enzymen sind die SH-Gruppen unmittelbar an der Bildung von Enzym-Substrat-Verbindungen beteiligt. Die Blockierung der SH-Gruppen dieser Enzyme führt dazu, daß das Enzym seine Wirksamkeit verliert (Netter, 1959; Weuffen, 1972).

2.1.1 Wachstum und Vermehrung von Bakterien- und Zellkulturen

Die qualitative und quantitative Beurteilung der oligodynamischen Wirkung unterschiedlicher Metalle erfordert eine genaue Kenntnis der Wachstumskinetik der untersuchten Organismen. Sowohl mikrobieller als auch zellulärer Metabolismus lassen sich im Experiment anhand des Wachstums und der Vermehrung sehr gut verfolgen. Bakterien zeichnen sich im Vergleich mit Zellen durch eine besonders hohe Geschwindigkeit des Stoffwechsels aus. Bei der Analyse des Wachstums einer Bakterienpopulation bzw. einer Gewebekultur ist darauf zu achten, daß sich die Ergebnisse der meisten Untersuchungen aus der Überlagerung der Meßgrößen der einzelnen Zellen zusammensetzen, daß also die Statistik der Population bedeutsam ist. Die Bestimmung des Wachstums eines einzelnen Organismus ist in der Regel nur in Gewebekulturen, nicht jedoch in einer Bakterienpopulation möglich.

Grundsätzlich lassen sich in einer Bakterien- oder Zellkultur vier charakteristische Abschnitte (Stanier et al, 1980; Otte et al, 1978; Jacherts, 1964) sowie entsprechende Übergangsphasen im Wachstumsverhalten unterscheiden.

In Abb. 2.1 ist der schematische Verlauf der mikrobiellen Wachstumskinetik aufgezeigt.

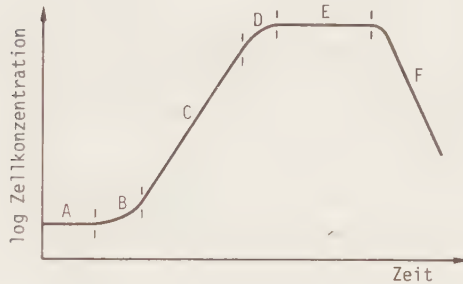


Abb. 2.1 Schematische Darstellung der Wachstumskurve einer Bakterienkultur in einem flüssigen Nährmedium. A=Latenzphase, B=Beschleunigungsphase, C=exponentielle Phase, D=Verzögerungsphase, E=stationäre Phase, F=Deklinationsphase

Die vier wichtigsten Phasen sind:

1. Latenzphase oder Lagphase

Verarmt an Metaboliten und Enzymen als Folge der ungünstigen Bedingungen am Ende ihrer vorherigen Züchtungsperiode adaptieren sich die Zellen an ihr neues Milieu. Enzyme und Stoffwechselzwischenprodukte werden gebildet und angereichert, bis sie in einer Konzentration vorliegen, die es den Mikroorganismen gestatten, sich erneut zu vermehren.

2. Exponentielle Phase

Mit der Anpassung der Zellen an das Nährsubstrat setzt ein starkes Wachstum bzw. Zellvermehrung ein. Über die Beschleunigungsphase erreicht die Kultur den Zustand maximaler Zellvermehrung. Diese ist durch die exponentielle Zunahme von Zellzahl und Zellgröße charakterisiert. Die Zeitkonstante des Wachstums (Generationszeit) hängt

ab von den jeweiligen Milieubedingungen. Die Veränderung des pH-Wertes durch Ansäuerung des Mediums aufgrund des Abbaus von Kohlenhydraten spielt eine wesentliche Rolle für die Limitierung des Wachstums der Mikroorganismen; die Kultur tritt ein in eine Phase verzögerten Wachstums.

3. Stationäre Phase

Während dieses Zeitraumsteilt sich zwar noch eine große Anzahl von Zellen, jedoch bleibt die Zellzahl pro Volumeneinheit konstant, da im gleichen Verhältnis, in dem sich noch Mikroorganismen teilen, andere absterben.

4. Deklinations- oder Absterbephase

Die Zellzahl nimmt kontinuierlich ab. Die Dauer der Absterbephase ist abhängig von den Milieubedingungen.

Die Abb. 2.2 zeigt deutlich die Wirkung des Nährsubstrats auf das Wachstum der Mikroorganismen; das Phänomen der Diauxie. Die verschiedenen Nährkomponenten wie Glucose und Lactose werden nacheinander verbraucht, was in einem zweiphasigen Wachstum oder in einem doppelten Wachstumszyklus ("treppenförmiger" Kurvenverlauf) zum Ausdruck kommt.

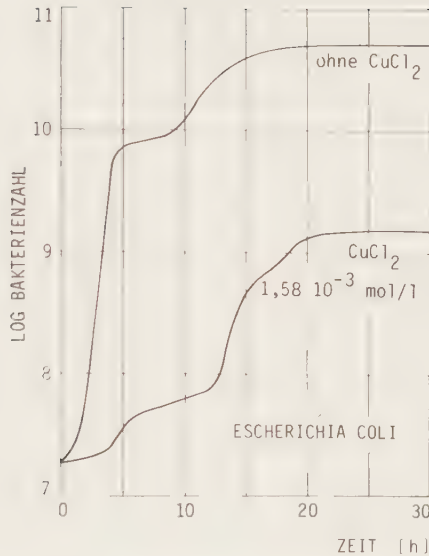


Abb. 2.2 Diauxischer Wachstumsverlauf von *Escherichia coli* mit und ohne Kupferionen. Die Messung erfolgte unter Verwendung von Tryptic-Soy-Medium. Der „trep-penförmige“ Kurvenverlauf zeigt, daß verschiedene Nährkomponenten nacheinander verwertet werden. Deutlich ist der oligodynamische Effekt von Kupfer-
ionen erkennbar.

Im Verlauf der einzelnen Wachstumsphasen unterliegen sowohl der Stoffwechsel der kultivierten Zellen, als auch ihre Zusammensetzung starken Veränderungen. So ist z.B. am Ende der Latenzphase eine signifikante Anreicherung an RNS zu beobachten. Während der exponentiellen Phase steigen die Werte für RNS, DNS und Protein mit derselben Geschwindigkeit, bis die maximale Populationsdichte erreicht ist. Anschließend, in der stationären Phase verlangsamten sich die synthetischen Prozesse, zuerst die der RNS, schnell gefolgt von denen der Proteine.

2.1.2 Kinetisches Modell zur Bestimmung der Wachstums- bzw. Absterbegeschwindigkeit von Zellen

Entsprechend der bebräuchlichsten Methode zur Bestimmung des bakteriellen Wachstums, der Lebendkeimzahlbestimmung in Form der sogenannten Koloniezahlbestimmung, beschränken sich alle bisher üblichen Modelle der Wachstumskinetik auf die Betrachtung der Zellteilungsgeschwindigkeit der Bakterienpopulation. Einflüsse des gleichermaßen vorhandenen Absterbens eines Teils der Kultur auf das Populationsgleichgewicht werden vernachlässigt. Hierdurch geht jedoch wesentliche Information über die Wachstumskinetik verloren. Mit Hilfe eines hier vorgestellten, neuen kinetischen Wachstumsmodells läßt sich aus einer Messung der Gesamtzahl der Bakterien auch eine Selektion nach lebenden und toten Mikroorganismen durchführen, wodurch die Kinetik vollständig bestimmt ist. Unter dem Tod einer Bakterie wird hier stets deren irreversibler Verlust der Fähigkeit zur Reproduktion verstanden.

Die Gesamtzahl (B_g) der Zellen einer Kultur setzt sich zusammen aus der Anzahl der lebenden (B_l) und toten Bakterien (B_t), die nebeneinander im Nährmilieu M vorhanden sind:

$$(2.1) \quad B_g(t, pH, M) = B_l(t, pH, M) + B_t(t, pH, M)$$

Neben der Zeit (t) sind der pH-Wert und die Zusammensetzung des Mediums von besonderer Bedeutung für die Entwicklung der Population.

Obwohl der Zeitpunkt der Teilung oder des Absterbens einer einzelnen Zelle innerhalb der Kultur unbestimmbar ist, erfolgen diese jedoch prinzipiell zu einem diskreten Zeitpunkt, so daß die Vermehrung der Population einen diskontinuierlichen Prozeß darstellt, der sich jedoch bei hinreichend großer Bakterienzahl wegen der statistischen Verteilung (asynchrones Wachstum) als kontinuierlich betrachten

läßt. Die Entwicklung der Population ist durch die Wachstums- und Sterberate sowie deren gegenseitige Relation gekennzeichnet. Die Wachstumsrate, bzw. Wachstumsgeschwindigkeit w gibt an, welcher Anteil der insgesamt vorhandenen lebenden Bakterien sich zu einem bestimmten Zeitpunkt teilt. Dementsprechend bezeichnet die Absterberate s den Anteil der absterbenden Bakterien.

Die zeitliche Änderung der Zahl der lebenden Bakterien setzt sich folglich zusammen aus einem positiven Anteil, der die Vermehrung durch Zellteilung beschreibt, und einem negativen, der die Verminderung der lebenden Zellen durch Absterben angibt. Demzufolge gilt:

$$(2.2) \quad \frac{dB_1(t, pH, M)}{dt} = w(t, pH, M) B_1(t, \bar{pH}, M) - s(t, pH, M) B_1(t, pH, M)$$

Wachstums- und Absterbegeschwindigkeit sind zeitlich nicht konstant. Sie hängen von den Startbedingungen der Population und der Zusammensetzung des Nährmediums ab, insbesondere von dessen pH-Wert und davon, ob die in dem Substrat enthaltenen Nährsubstanzen, wie z.B. Lactose und Glucose nacheinander verbraucht werden (Diauxie, Abb. 2.2) oder gleichzeitig (Abb. 2.1)

Zur Charakterisierung der Wachstumskinetik einer Kultur müssen Wachstums- und Absterbegeschwindigkeit gemessen werden. Mit Hilfe der Lebendkeimzahlbestimmung ist dies nicht möglich, da mit dieser Methode zwar die Zahl der lebenden Bakterien sowie deren zeitliche Änderung erfaßt werden kann, eine Separation nach w und s ist jedoch nicht durchführbar. Die Methode der Vitalfärbung, - als Farbstoffe werden Trypanblau, Safranin, Erythrosin und Eosin verwandt (Paul, 1975) - die darauf beruht, daß die Oberflächenmem-

bran lebender Zellen fähig ist, selektiv gewisse Substanzen auszuschließen, während tote Zellen diese Substanzen leicht ins Zellinnere eindringen lassen, d.h. man kann lebende und tote Bakterien unterscheiden, wurde nicht angewandt, da die Registrierung der Zellzahl große Schwierigkeiten bereitet und mit hohen Fehlerquoten behaftet ist.

Alle übrigen Methoden der Zellzahlbestimmung erfassen nur die Gesamtzahl der Bakterien, was zur Folge hat, daß zunächst weder die Zahl der lebenden noch die der toten, sondern nur deren Summe bekannt ist. Im Gegensatz zur Methode der Lebendkeimzahlbestimmung im Sinne der Koloniezahlermittlung lassen sich jedoch bei Messung der Gesamtzahl aus der Analyse der zeitlichen Änderung von B_g sowohl w und s als auch B_l und B_t bestimmen.

Die zeitliche Änderung (Zuwachs) der Gesamtzahl der in der Kultur enthaltenen Zellen bestimmt sich durch Differentiation von Gl. 2.1 zu:

$$(2.3) \quad \frac{dB_g}{dt} = \frac{dB_l}{dt} + \frac{dB_t}{dt}$$

Da die zeitliche Änderung der toten Bakterien B'_t gerade der Sterbequote $s \cdot B_l$ entspricht, reduziert sich Gl. 2.3 durch Einsetzen von Gl.2.2 zu:

$$(2.4) \quad B'_g = w \cdot B_l$$

Betrachtet man nur sehr kleine zeitliche Intervalle des bakteriellen Wachstums, dann kann angenommen werden, daß Wachstumsgeschwindigkeit w und Absterbegeschwindigkeit s konstant sind, wenn die Bereiche nur klein genug gewählt

wurden. Unter dieser Bedingung ergibt sich als Lösung der Gl. 2.2 für die Zahl der lebenden Bakterien:

$$(2.5) \quad B_1(t) = B_{10} \cdot e^{(w-s) \cdot t}$$

B_{10} ist die Zahl der lebenden Bakterien zu Beginn des betrachteten Intervalls. Der Zeitnullpunkt liegt am Intervallanfang. Die experimentelle Überprüfung zeigt, daß dies eine sehr gute Näherung der bakteriellen Wachstums-kinetik darstellt.

Gl. 2.5 eingesetzt in Gl. 2.4 ergibt:

$$(2.6) \quad \frac{dB_g}{dt} = w B_{10} \cdot e^{(w-s) \cdot t}$$

Durch Logarithmieren geht Gl. 2.6 über in:

$$(2.7) \quad \ln \frac{dB_g}{dt} = \ln w + \ln B_{10} + (w-s) \cdot t$$

Durch Differentiation kann hieraus $(w-s)$ bestimmt werden:

$$(2.8) \quad (w-s) = \frac{d}{dt} \ln \frac{dB_g}{dt}$$

Wird Gl. 2.6 nach w aufgelöst, dann ergibt sich:

$$(2.9) \quad w = \frac{\frac{dB_g(t)}{dt}}{B_{10} \cdot e^{(w-s) \cdot t}}$$

Ist also die Anfangszahl der lebenden Bakterien bekannt, dann sind nach Gl. 2.8 und Gl. 2.9 w , $(w-s)$ und damit s durch die Messung der Gesamtzahl bestimmbar.

Prinzipiell ist die vorangehende Darstellung der Wachstumsparameter auch hinsichtlich Fibroblasten gültig.

2.2 Physikalische Grundlagen

Über rein biochemische Betrachtungen der metabolischen Prozesse sowie phänomenologische Analysen des wachstums-kinetischen Verhaltens der Mikroorganismen bzw. Zellen hinaus, setzt die Aufklärung der oligodynamischen Wirkungsmechanismen die Kenntnis der physikalischen Eigenschaften des komplexen Biotops als ganzem, seiner organisch-anorganischen Komponenten sowie der einzelnen Phasengrenzen voraus. Die wesentlichen Größen wie elektrochemische Potentiale und Phasengleichgewichte lassen sich mit Hilfe der irreversiblen Thermodynamik beschreiben. Die Bestimmung der Proteinaffinität der Metalle erfordert sowohl eine thermodynamische als auch atomistische Behandlung.

2.2.1 Thermodynamik elektrochemischer Potentiale

Die gesamten Verteilungsprozesse und chemischen Reaktionen, die in dem biologischen System stattfinden, werden von elektrochemischen Potentialen hervorgerufen bzw. beeinflusst.

Von besonderer Bedeutung für die vorliegende Problemstellung ist der Transport von Ladungsträgern, seien es nun die Ionenflüsse innerhalb des Nährmediums und der Zellen, oder Elektronenflüsse im Metall. Sowohl die stattfindenden Diffusionsprozesse im Elektrolyten und an der Zellmembran, als auch die Phasengrenze Metall-Substrat lassen sich mittels elektrochemischer Potentiale beschreiben.

2.2.1.1 Chemisches Potential

Die thermodynamische Beschreibung von stofflichen Zustandsänderungen und Phasenübergängen (Metall-Lösung) erfolgt am einfachsten mit Hilfe des chemischen Potentials (Becker, 1966; Reif, 1976). Dessen Relationen zu den übrigen thermodynamischen Potentialen sollen im folgenden kurz dargestellt werden.

Die Entropie eines homogenen Systems ist abhängig von seiner inneren Energie E , seinem Volumen V , sowie seiner stofflichen (chemischen) Zusammensetzung. Kennzeichnet N_i die Anzahl der Moleküle der m verschiedenen in dem System enthaltenen Molekülarten, dann gilt:

$$(2.10) \quad S = S(E, V, N_1, \dots, N_m)$$

Die Größen E , V und N_i sind Variable, die sich im Verlaufe eines physikalischen oder chemischen Prozesses, den das System durchläuft, charakteristisch verändern. Für die damit verbundenen Entropieänderungen gilt bei einem infinitesimalen quasistatischen Prozeß:

$$(2.11) \quad dS = \left(\frac{\partial S}{\partial E} \right)_{V, N} dE + \left(\frac{\partial S}{\partial V} \right)_{E, N} dV + \sum_{i=1}^m \left(\frac{\partial S}{\partial N_i} \right)_{E, V, N} dN_i$$

Betrachtet man eine Zustandsänderung des Systems, bei dem keine chemische Reaktionen ablaufen, die mit einer stofflichen Umwandlung verbunden sind, d.h. $dN_i = 0$ für alle i , dann kann die Entropieänderung auch mit Hilfe der Fundamentalgleichung der Thermostatistik beschrieben werden:

$$(2.12) \quad dS = \frac{dQ}{dt} = \frac{dE + pdV}{T}$$

Durch Koeffizientenvergleich von Gl. 2.11 und Gl. 2.12 erhält man:

$$(2.13) \quad \left(\frac{\partial S}{\partial E} \right)_{V, N} = \frac{1}{T} \quad \text{und} \quad \left(\frac{\partial S}{\partial V} \right)_{E, N} = \frac{p}{T}$$

Mit der Definition eines chemischen Potentials

$$\mu_j = - T \left(\frac{\partial S}{\partial N_j} \right)_{E, V, N}$$

geht Gl. 2.11 durch Einsetzen von Gl. 2.13 über in:

$$(2.14) \quad dS = \frac{1}{T} dE + \frac{p}{T} dV - \sum \frac{\mu_i}{T} dN_i$$

Berücksichtigt man die thermodynamische Relation für die freie Enthalpie

$$d(E - TS + pV) = dG$$

dann läßt sich das chemische Potential auch schreiben:

$$(2.15) \quad \mu_j = \left(\frac{\partial G}{\partial N_j} \right)_{T, p, N}$$

Das chemische Potential hat die Dimension einer Energie. Die freie Enthalpie G für n_j Mole der j -ten Komponente in Abhängigkeit von ihrer chemischen Aktivität a_j lautet:

$$(2.16) \quad G_j = G_j^0 + n_j RT \ln a_j$$

Daraus erhält man als partielle molare freie Enthalpie bzw. chemisches Potential:

$$(2.17) \quad \left(\frac{\partial G}{\partial n_j} \right)_{T, p, n_i} = \mu_j = \frac{G^0}{n_j} + RT \ln a_j = \mu_j^0 + RT \ln a_j$$

$$\text{mit } a_j = \begin{cases} c_j & (\text{Konzentration}) \text{ für ideal gelösten Stoff} \\ x_j & (\text{Molenbruch}) \text{ für ideales Lösungsmittel} \\ p_j & (\text{Partialdruck}) \text{ für ideales Gas} \end{cases}$$

Ist die den Stoff j enthaltende Phase nicht ideal, so ist in der chemischen Aktivität neben der Konzentration, dem Molenbruch, bzw. dem Partialdruck noch ein Korrekturfaktor (Aktivitätskoeffizient) zu berücksichtigen. Dieser

ist per Definition so zu wählen, daß Gl. 2.17 gültig ist.

Befinden sich in einem System zwei stofflich gleichartige zusammengesetzte Phasen mit verschiedener Konzentration des gelösten Stoffes in Verbindung, dann gilt für die Differenz der chemischen Potentiale:

$$(2.18) \quad \mu_1 - \mu_2 = \mu^0 + RT \ln c_1 - \mu^0 - RT \ln c_2 = \\ = RT \ln \frac{c_1}{c_2}$$

Die Differenz der chemischen Potentiale zwischen den beiden Phasen stellt die Triebkraft für den Übergang zwischen den beiden Phasen dar. Sie bringt zum Ausdruck, daß sämtliche Verteilungsprozesse und Reaktionen von Konzentrationsunterschieden, Potentialen, abhängig sind.

2.2.1.2 Elektrochemisches Potential

Im vorangehenden Abschnitt wurde der Übergang zwischen zwei Phasen ausschließlich mit Hilfe des chemischen Potentials beschrieben, das die freiwerdende bzw. aufzubringende Energie beim Übergang angibt.

Die entsprechende Reaktion kann jedoch nicht bis zum chemischen Gleichgewicht ablaufen, wenn es sich um Transporte von Ionen handelt, da sich mit Beginn der Reaktion zwischen beiden Phasen eine elektrische Potentialdifferenz (Vetter, 1961; Hamann, 1975) ausbildet, die dem chemischen Potential entgegengesetzt gerichtet ist.

Die zwischen den beiden Phasen entstehende elektrische Potentialdifferenz nimmt also Einfluß auf die Gleichgewichtseinstellung. Die Bedingung für das Gleichgewicht zwischen beiden Phasen ist, daß die Summe aus chemischem und elektrischem Potential, die als elektrochemisches Potential μ^* bezeichnet wird, in beiden Phasen gleich ist:

$$(2.19) \quad \mu_j(I) + z_j F \varphi(I) = \mu_j(II) + z_j F \varphi(II)$$

$\varphi(I)$, $\varphi(II)$ bedeuten die elektrischen Potentiale der beiden Phasen. z_j ist die Wertigkeit der Ionen, F die Faraday-Konstante.

Zusammen mit Gl. 2.17, dem chemischen Potential, ergibt sich für das elektrochemische Potential:

$$(2.20) \quad \mu_j^* = \mu_j + z_j F \varphi = \mu_j^O + RT \ln a_j + z_j F \varphi$$

Das elektrochemische Gleichgewicht ist zum einen vom chemischen Potential einer einzelnen Ionensorte j , zum anderen vom Ladungszustand der Phase, also von ihrem elektrischen Potential abhängig.

Stehen zwei Mischphasen eines Systems in direktem Kontakt miteinander, dann befindet es sich im elektrochemischen Gleichgewicht, wenn das elektrochemische Potential jeder im System vorhandenen Komponente j in beiden Phasen gleich ist.

Beim Eintauchen eines Metalls in einen Elektrolyten ist im allgemeinen diese Gleichgewichtsbedingung zunächst nicht erfüllt. Da aber jedes System bestrebt ist, den Zustand des Phasengleichgewichts einzunehmen, tritt eine Ausgleichsreaktion auf, Metallabscheidung oder -auflösung, die solange abläuft, bis sich das Gleichgewicht eingestellt hat. Die Richtung der Reaktion ist abhängig von den herrschenden Verhältnissen:

$$(2.21) \quad \begin{array}{ll} \text{a) } \mu_{Me}^{z+}(\text{Metall}) > \mu_{Me}^{z+}(\text{Lösung}) & \text{Metallabscheidung} \\ \text{b) } \mu_{Me}^{z+}(\text{Metall}) < \mu_{Me}^{z+}(\text{Lösung}) & \text{Metallauflösung} \end{array}$$

Die Reaktionsgeschwindigkeit hängt ab von ihrer Triebkraft, die mit Hilfe der freien Enthalpie G beschrieben wird.

2.2.1.3 Phasengrenze Metall-Substrat

Während der elektrische Strom im metallischen Leiter als Elektronenstrom fließt, wird der Strom in einem Elektrolyten (Substrat) oder in einer Gewebekultur durch Ionen getragen. Der Übergang von der Elektronenleitfähigkeit zur Ionenleitfähigkeit kann an der Phasengrenze durch Auflösung des Metalls



erfolgen (Hamann, 1975).

Der elektrische Zustand der Phasengrenze Metall-Substrat läßt sich durch eine charakteristische Potentialverteilung beschreiben. Durch Adsorption einer starren Dipolschicht hydratisierter Ionen (Helmholtzschicht) an die Metalloberfläche wird im Elektrolyten eine diffuse Raumladungszone (Gouyschicht) induziert. Im metallischen Lei-

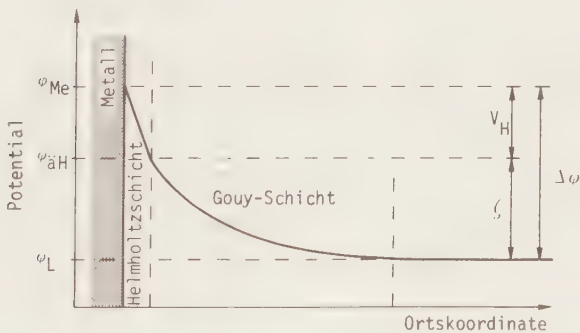


Abb. 2.3 Potentialverlauf an der Phasengrenze Metall-Substrat nach Hamann

ter baut sich zum Ladungsausgleich eine Oberflächenladung entgegengesetzten Vorzeichens auf. Während das Potential in der Helmholtzschicht linear abfällt (Abb. 2.3) ist die

Gouyschicht durch einen exponentiellen Potentialabfall gekennzeichnet.

Wird dem Phasenübergang ein Strom eingeprägt oder dem Doppelschichtpotential eine zusätzliche Spannung überlagert, dann wird das Gleichgewicht der Phasengrenze gestört. Die Größe der Abweichung des Elektrodenpotentials vom Gleichgewichtspotential bei Stromfluß wird als Überspannung η bezeichnet.

$$(2.23) \quad \eta = \varphi - \varphi_0$$

Die Verschiebung des Elektrodenpotentials rührt hauptsächlich von der sogenannten Durchtrittsüberspannung her, die auf der endlichen Geschwindigkeit des Ladungsdurchtritts durch die Doppelschicht (Durchtrittshemmung) beruht. Die Durchtrittsgeschwindigkeit hängt von der Art und Konzentration der an der Durchtrittsreaktion beteiligten Ionen ab. Neben der Durchtrittshemmung können Hemmungen durch zu langsamen Stofftransport aus der Lösung zur Elektrodenoberfläche oder umgekehrt (Diffusionshemmung, Diffusionsüberspannung) erfolgen (Hamann, 1981).

Bei Bestimmung des Potentials einer Metallelektrode in einer elektrolytischen Lösung können wegen des zur Messung erforderlichen Stroms durch die Überspannung Meßfehler verursacht werden. Damit der Einfluß dieser Effekte auf die Potentialbestimmung möglichst vernachlässigbar sind, müssen hochohmige Meßverstärker benutzt werden, die einen minimalen Strom garantieren.

2.2.1.4 Membranpotentiale

Die Zellumhüllung setzt sich bei Bakterien aus der zytoplasmatischen Membran (Stanier, 1980; Otte, 1978; Jacherts, 1964) und der sie umgebenden Zellwand zusammen. Die Funktion der Zellwand ist in der Erhöhung der

Widerstandsfähigkeit gegen äußere Einflüsse zu sehen. Sie stellt keine semipermeable Membran dar und ist für niedermolekulare Substanzen gut durchlässig. Als äußerste Umhüllung der Bakterienzelle tritt sie in direkte Wechselwirkung mit der Umwelt (Abb. 2.4).

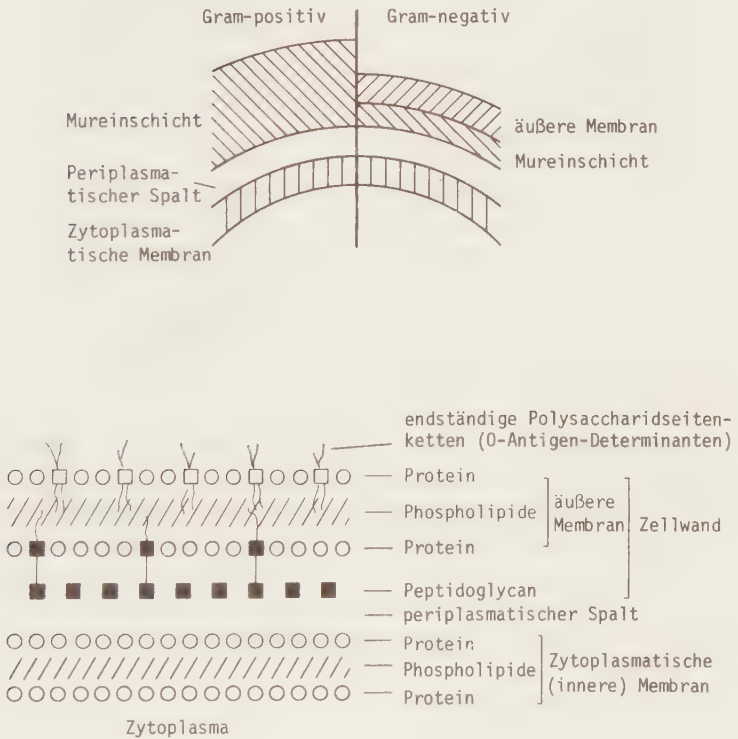


Abb. 2.4 (a) Zytoplasmatische Membran und Zellwand bei grampositiven und gramnegativen Bakterien.
 (b) Struktur der Zellwand und zytoplasmatischen Membran.
 Modifiziert nach Otte

Die zytoplasmatische Membran ist für die Lebensfähigkeit der Zelle, sowohl der Bakterien als auch der Fibroblasten, von entscheidender Bedeutung. Sie umhüllt das Zytoplasma und ist nach dem gleichen Prinzip wie alle biologischen Membranen (Elementarmembranen) aus Proteinen und Lipiden aufgebaut. Die Proteinmoleküle, die auf beiden Seiten der Lipidschicht gelagert sind, sind dabei sehr viel weniger dicht angeordnet als die Lipidmoleküle. Die Lipidschicht stellt für die meisten Substanzen eine Barriere dar. Eine große Permeabilität weist sie lediglich für sehr kleine Moleküle, wie z.B. H_2O , auf. Die zytoplasmatische Membran hat folgende Funktionen:

1. osmotische Barriere zwischen intra- und extrazellulärem Raum (semipermeable Membran),
2. aktiver Transport von Molekülen, d.h. selektive Steuerung des Eintritts und Austritts von Substanzen mit Hilfe von Proteinen (Permeasen), und
3. Sitz von Enzymsystemen, die für den Elektronentransport, die oxidative Phosphorylierung und die Lipidbiosynthese, die letzte Stufe der Biosynthese von Zellwand- und Kapselpolymeren verantwortlich sind.

Da Elektrolyte und Proteine im Substrat überwiegend dissoziiert sind, entstehen beim Transport der Ionen Potentialdifferenzen zwischen Zellinnerem und Zelläußerem, die als Membranpotentiale bezeichnet werden. Das Transmembranpotential (Rein et al, 1971) ist abhängig vom Verhältnis der Ionenkonzentrationen innerhalb und außerhalb der Zelle. Besteht ein Konzentrationsgefälle über die Zellmembran, so stellt sich nach der Nernstschen Gleichung ein elektrisches Potential ein:

$$(2.24) \quad -\Delta \varphi = \frac{R T}{F} \sum_i \frac{1}{z_i} \ln \frac{c_i^i}{c_i^e}$$

z_i = Valenz der Ionenart i , R = Gaskonstante, T = absolute Temperatur, c_i^i = intrazelluläre Konzentration der Ionsor-

te i , c_i^e = extrazelluläre Konzentration der Ionensorte i . Das Verhältnis der intra- und extrazellulären Konzentration frei diffundierbarer Kationen und Anionen wird durch das Donnan-Gleichgewicht g charakterisiert (Abb. 2.5):

$$\frac{c_+^e}{c_-^e} = \frac{c_+^i}{c_-^i} = g$$

Ist $g = 1$, was bedeutet, daß intra- und extrazellulär gleiche Ionenkonzentrationen herrschen, dann existiert kein Potentialgefälle an der Zellmembran. Die in jeder lebenden Zelle vorhandenen fixierten, negativ geladenen Proteine beeinflussen jedoch die Konzentration der frei diffun-

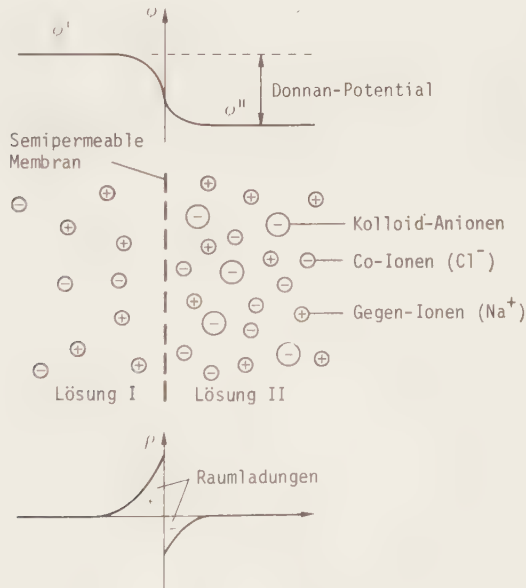


Abb. 2.5 Potentialverlauf und Ladungsverteilung an einer semipermeablen Membran. Modifiziert nach Hamann

dierbaren Ionen. Wegen der Forderung nach elektrischer Neu-

tralität innerhalb und außerhalb der Zelle gilt:

$$c_+^e = c_-^e \quad \text{und} \quad c_+^i = c_-^i + (\text{Pr}_-).$$

Daraus folgt, daß

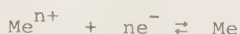
$$c_+^i > c_-^i$$

Dementsprechend ist das Donnan-Gleichgewicht der lebenden Zelle im Ruhezustand stets kleiner als 1. Da im Zellinneren eine erhöhte Konzentration diffundierbarer Ionen herrscht, ist der intrazelluläre osmotische Druck größer als der extrazelluläre. Die Druckdifferenz $\Delta\pi$ wird als kolloidosmotischer Druck bezeichnet. Reagieren die negativ geladenen Ionen, so daß der entstehende Komplex elektrisch neutral erscheint, dann bricht das Transmembranpotential sowie der kolloidosmotische Druck zusammen. Dies führt zum Absterben der Zelle, was durch eine Änderung der Morphologie erkennbar wird (vgl. Kap. 5.2).

2.2.2 Thermodynamisches Phasengleichgewicht

Beim Auflösen eines Festkörpers bzw. Herauslösen von Ionen in einem Elektrolyten, wie es an der Phasengrenze Metall-elektrode-Substrat erfolgt, ist eine Energiezufuhr erforderlich (Gitterenergie). Die Ionen üben auf die Wasserdipole starke Anziehungskräfte aus und umgeben sich daher mit einer Hydrathülle, wobei die Hydratationsenergie frei wird (Vetter, 1961; Hamann et al, 1975). Ist die Hydratationsenergie größer als die Gitteraustrittsenergie, dann läuft die Reaktion exotherm ab.

Die Auflösung des Metalls läßt sich darstellen als:



Die Gleichgewichtskonstante K dieser Reaktion wird als Boudouard-Konstante bezeichnet. Sie kennzeichnet das Verhältnis der Aktivitäten der Reaktionspartner:

$$(2.25) \quad K = \frac{a_{\text{Me}^{n+}}}{a_{\text{Me}}}$$

Im Gleichgewichtszustand müssen die elektrochemischen Potentiale der beiden Phasen gleich sein:

$$(2.26) \quad \mu_{\text{Me}} + zF \varphi_{\text{Me}} = \mu_{\text{Me}^{n+}} + zF \varphi_{\text{Me}^{n+}}$$

Daraus folgt:

$$(2.27) \quad \varphi_{\text{Me}} - \varphi_{\text{Me}^{n+}} = \frac{\mu_{\text{Me}^{n+}} - \mu_{\text{Me}}}{zF} = \Delta \varphi$$

Nach Gl. 2.20 gilt:

$$(2.28) \quad \Delta \varphi = \frac{1}{zF} (\mu_{\text{Me}^{n+}}^{\circ} + RT \ln a_{\text{Me}^{n+}} - \mu_{\text{Me}}^{\circ} - RT \ln a_{\text{Me}})$$

oder:

$$(2.29) \quad \Delta \varphi = \frac{1}{zF} (\mu_{\text{Me}^{n+}}^{\circ} - \mu_{\text{Me}}^{\circ} + RT \ln \frac{a_{\text{Me}^{n+}}}{a_{\text{Me}}})$$

Dabei ist

$$\mu_{\text{Me}^{n+}}^{\circ} - \mu_{\text{Me}}^{\circ} = \Delta G^{\circ}$$

und

$$\frac{\Delta G^{\circ}}{zF} = \varphi_{\circ}$$

$\varphi_{\circ}$ ist das Normalpotential. Damit ergibt sich für die Potentialdifferenz zwischen Metall und Elektrolyt:

$$(2.30) \quad \Delta \varphi = \varphi_{\circ} + \frac{RT}{zF} \ln \frac{a_{\text{Me}^{n+}}}{a_{\text{Me}}}$$

Nach Gl. 2.17 ist für die chemische Aktivität des Metalls der Elektrode deren Molenbruch in Gl. 2.30 einzusetzen. Beschränkt man die Betrachtung auf reine Metalle, so ist der Molenbruch gleich 1. Die Aktivität des gelösten Metalls ist in idealen Lösungen gleich seiner Konzentration. Für ein reines Metall ergibt sich dementsprechend für die Konzentration an gelöstem Metall:

$$(2.31) \quad c_{\text{Me}} = \exp \left(\frac{(\Delta\varphi - \varphi_0) \cdot zF}{RT} \right)$$

Mit Hilfe dieser Relation ist es möglich bei Kenntnis des Normalpotentials durch Messung des Elektrodenpotentials die Konzentration des in Lösung gehenden Metalls zu bestimmen. Ist die Lösungsphase nicht ideal, dann ist die Konzentration des gelösten Metalls durch einen Faktor (Aktivitätskoeffizient) zu korrigieren.

Besteht die Elektrode aus einer Legierung, dann ist in Gl. 2.30 die Aktivität der einzelnen Metalle ($\neq 1$) entsprechend zu berücksichtigen. Sie läßt sich mit Hilfe geeigneter galvanischer Ketten bestimmen (Rickert, 1973).

Da im Gleichgewichtszustand bei allen Elektroden die elektrochemischen Potentiale beider Phasen (Elektrode-Elektrolyt) stets gleich sind und sich thermodynamisch durch die Nernst'sche Gleichung darstellen lassen, ist diese Methode der Konzentrationsbestimmung auch auf diejenigen Metallelektroden anwendbar, deren Oberflächen eine Passivschicht aufweisen, wie z.B. Titan (TiO_2). Grundlage für die Rechnung sind die jeweiligen vollständigen Auflösungsreaktionen, die sich von derjenigen der aktiven Metallelektrode unterscheiden (Vetter, 1961). In diesem Fall sind das Normalpotential sowie die Aktivität des passivierten Metalls bestimmend für die Lösungskonzentration.

Die Betrachtung beschränkt sich auf das thermodynamische Gleichgewicht der Phasengrenze, bei dem kein äußerer Strom fließt. Dementsprechend muß die Potentialmessung möglichst

stromlos erfolgen. Dynamische Prozesse, die beim Eintauchen des Metalls in den Elektrolyten ablaufen, waren bei der Durchführung der dargestellten Untersuchungen nicht zu berücksichtigen. Die Experimente wurden erst nach Erreichen des Gleichgewichts durchgeführt. Veränderungen der Elektrodenoberfläche während der Versuchsdurchführung (z.B. Aktivierung oder Passivierung) wurden nicht beobachtet, sodaß sich die Konzentrationsbestimmung mittels Potentialmessung bei allen untersuchten Elektroden ohne Schwierigkeiten anwenden ließ.

Da eine praktische Durchführung dieser Methode der Konzentrationsbestimmung in der Literatur nicht beschrieben wurde, mußte in der vorliegenden Arbeit sowohl ihre Präzision (Kap. 3.3.3) als auch der Einfluß des Aktivitätskoeffizienten des gelösten Metalls analysiert werden. Es zeigte sich, daß bei den vorliegenden Lösungen ein Korrekturfaktor nicht berücksichtigt zu werden braucht, und daß die elektrochemischen Prozesse an der Grenzschicht Elektrode-Elektrolyt so langsam ablaufen, daß sich das System stets näherungsweise im Gleichgewicht befindet, was sich in einer hohen Präzision des Verfahrens ausdrückt.

3. Material und Methoden

Alle bisher publizierten Ergebnisse anderer Arbeitsgruppen zur Oligodynamie beschränken sich meist auf qualitative Ja-Nein-Aussagen, d.h. ein Material ist entweder antimikrobiell oder nicht, gewebeverträglich oder nicht. Vergleiche der einzelnen Stoffe untereinander beschränken sich auf die Feststellung, daß eine Abstufung der Wirksamkeit festzustellen ist, daß jedoch keine Systematik zuzuordnen ist, weil sich die Reihenfolge der Wirkungsstärke je nach Versuchsbedingungen ändern kann, ohne daß Gründe hierfür immer bekannt sind. Ziel der Arbeit ist es, die oligodynamische Wirkung von Metallen systematisch zu erfassen.

3.1 Bakterien- und Zellkulturen

3.1.1 Bakterien

Für die Untersuchungen der Oligodynamie wurden folgende drei Bakterienarten verwendet, die pathogen wirken können:

- a) Escherichia coli und Salmonella typhi-murium, zwei Arten aus der Familie der Enterobacteriaceae
- b) Staphylococcus aureus, eine Art aus der Familie der Micrococcaceae

Escherichia coli sind gramnegative, fakultativ anaerobe Stäbchenbakterien, die normalerweise im Darm der Warmblütler vorkommen. Außerhalb des Darmtraktes können sie beim Menschen Infektionen hervorrufen, besonders im Urogenitalsystem (Zystitis, Pyelitis).

Salmonella typhi-murium gehören zur Salmonellagruppe und sind wie diese gramnegative, peritrich begeißelte und

damit bewegliche, aerobe, nicht sporenbildende Stäbchen. *Salmonella typhi-murium* sind Vertreter der die akute Gastroenteritis (Nahrungsmittelvergiftung) auslösenden Salmonellagruppe.

Staphylococcus aureus sind grampositive, frei lebende, kugelige in Gruppen gelagerte Kokken. Ihr Durchmesser beträgt ungefähr $1\mu\text{m}$. Die Anordnung in Gruppierungen kommt dadurch zustande, daß sich diese Kokken wahllos in allen drei Ebenen des Raums teilen. Die Staphylococcen können für den Menschen pathogen sein, da sie sowohl lokale als auch generalisierte Infektionen verursachen können und zu den häufigsten Eitererregern gehören.

Als Nährmedium für die Mikroorganismen diente ein Gemisch aus steriler physiologischer Kochsalzlösung und Tryptic-Soy-Bouillon (15ml TSB und 12ml NaCl (0,9%)), das während der Messungen konstant bei 37°C gehalten wurde.

Die Ausgangskonzentration an Mikroorganismen in dieser Nährsubstanz betrug jeweils ca. $1,5 \times 10^8$ Keime/ml. Sie wurde nach dem Trübungsstandard Mc Farland eingestellt.

3.1.2 Fibroblastenkultur

Für die hier durchgeführten Untersuchungen wurden menschliche Fibroblasten verwendet, da diese Zellart am häufigsten mit Implantaten in Berührung steht.

Fibroblastenkulturen lassen sich von einer Reihe von Geweben gewinnen. Die Zellen besitzen eine rasche Verdopplungszeit, die für jede Zelllinie charakteristisch ist, und die ungefähr ein bis zwei Tage beträgt. Fibroblasten sind diploid und weisen eine charakteristische spindelförmige Morphologie auf, wie aus der folgenden

Abb. 3.1a (bzw. Abb.5.6) hervorgeht.

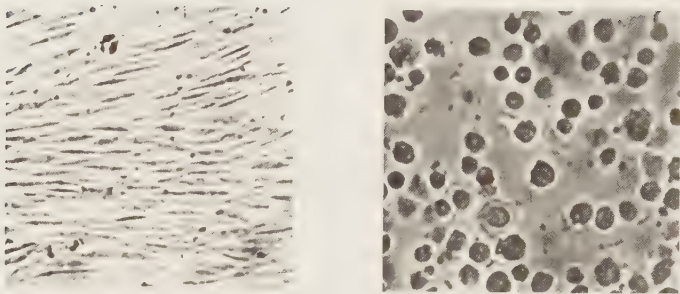


Abb. 3.1 Fibroblastenkultur (a) wird durch Trypsinierung suspendiert. Dadurch ziehen sich die Zellen, die eine spindelförmige Morphologie aufweisen, kugelförmig zusammen (b)

Zellen, die dazu in der Lage sind, sich wiederholt zu teilen, wie dies bei Fibroblasten zutrifft, lassen sich mehrfach passagieren. Dies geschieht indem die Zellen durch Trypsin-Behandlung in Suspension gebracht werden. Zum Trypsinieren einer Zellkultur ist folgende Trypsin-Lösung erforderlich:

- 14 ml Diaminoäthantetraessigsäure EDTA (0,2%)
- 20 ml Hanks-Lösung
- 1 ml Trypsin
- 35 mg Natriumhydrogencarbonat

Nach mehrmaligem Auswaschen der Zellkultur mit Hanks-Lösung (jede Spülung erfolgt mit 5 ml Hanks-Lösung pro Kulturflasche) werden 5 ml Trypsin-Lösung zugegeben.

Wenn die Zellen Kugelgestalt (Abb. 3.1b) angenommen - was nach ca. 5 Minuten geschieht - und sich vom Gefäßboden ab-

gehoben haben, wird sofort 1 ml fötales Kälberserum (FKS) zugegeben. Dieses Gemisch wird zentrifugiert und anschließend werden 2,5 ml vom Überstand abpipettiert. Danach werden die Zellen, die sich in der restlichen Flüssigkeit befinden, zusammen mit frischem Kulturmedium (27 ml Minimal Essential Medium MEM und 3 ml FKS pro Flasche) in neue Gewebekulturflaschen gesät. Die Kulturflasche wird mit CO_2 begast und dann konstant auf 37°C gehalten. Die Kultur der so passagierten Zellen nennt man Primärzelllinie. Die menschlichen Fibroblasten sind ein typisches Beispiel für eine besonders stabile Primärzelllinie, die niemals durch eine plötzliche Transformation zu einer etablierten Zelllinie wird.

3.2 Verwendete Metalle

Metallische Implantate werden in den verschiedensten Bereichen des menschlichen Körpers eingesetzt. Je nach Funktion müssen sie unterschiedliche Anforderungen hinsichtlich Abrieb-, Auslauge-, Degradations- und Erosionsfestigkeit sowie statische und Biegebelastungsfestigkeit (Thull, 1978) erfüllen. Während bei mechanisch belasteten Implantaten (Gelenkersatz z.B. Endoprothese) meist hochbelastbare Stähle (AISI 316L) oder besondere Edelmetallegerierungen, vor allem Kobalt-Basis-Legierungen (MP 35N), Verwendung finden, wird zur Einkapselung von mechanisch nicht belasteten Implantaten (z.B. Herzschrittmachern) hauptsächlich Titan benutzt. Unabhängig von ihrer Verwendung werden an die Implantatwerkstoffe folgende Forderungen gestellt:

1. Hohe Korrosionsfestigkeit
2. Gute Verarbeitbarkeit
3. Gewebeverträglichkeit
4. Sterilisierbarkeit

Eine weitere wünschenswerte Eigenschaft wäre die antimikrobielle Wirkung dieser Materialien, wie sie die speziell zur

Keimtötung benutzten Metalle aufweisen.

Die experimentellen Untersuchungen wurden an den wichtigsten Implantatwerkstoffen Titan, MP 35N und AISI 316L, sowie den für die Keimtötung besonders wichtigen Materialien Kupfer und Messing durchgeführt (Tab. 3.1).

Tab. 3.1

Zusammensetzung der untersuchten metallischen Werkstoffe

Kupfer	Cu	Cu 100%
Messing	Cu Zn	Cu 60% Zn 40%
Titan	Ti	Ti 100%
MP 35N	Co Ni Cr Mo Ti	Co 33% Ni 35% Cr 20% Mo 10% Ti 1%
AISI 316L	Fe Cr Ni Mo	Fe 65% Cr 18% Ni 14% Mo 3%

Die metallischen Proben (Scheibendurchmesser = 26,5 mm, Dicke = 1 mm) wurden nach eingehender Reinigung autoklaviert, um ihre Keimfreiheit gewährleisten zu können.

Um unabhängig von Oberflächeneinflüssen und Löslichkeiten der einzelnen metallischen Festkörper die Reihenfolge der Gewebeverträglichkeit und antimikrobiellen Wirkung der einzelnen Metalle zu bestimmen, wurden diese den Bakterien- und Gewebekulturen in weiteren Experimenten in Form löslicher Salze (Chloride) zugegeben (Tab. 3.2).

Tab. 3.2

Zur Analyse der oligodynamischen Wirksamkeit benutzte Metallchloride

Metall	Zugabe als:
Titan	TiCl_3
Kobalt	CoCl_2
Nickel	NiCl_2
Kupfer	CuCl_2
Eisen	FeCl_3

3.3 Meßmethoden

Zur Aufklärung der Wechselwirkungsmechanismen zwischen Organismen und Metallen ist es zunächst erforderlich, die phänomenologischen Effekte genau zu untersuchen, die wesentlichen Parameter zu quantifizieren und ein zuverlässiges Maß für die stoffwechselhemmende Wirkung der Metalle zu definieren. Auf der Basis der resultierenden Ergebnisse können dann mit Hilfe des in Kap. 2.1.2 entwickelten dynamischen Wachstumsmodells Rückschlüsse auf diejenigen Prozesse gezogen werden, die entscheidend sind für die oligodynamische Wirkung der Metalle. Hieraus abgeleitete Modellvorstellungen für den Einfluß der Metalle auf Bakterien und Gewebezellen werden durch theoretische thermodynamisch-biologische Überlegungen und experimentelle Strukturanalysen auf ihre Richtigkeit hin überprüft und vervollständigt. Als Ergebnis der Messungen lassen sich dann die für die stoffwechselhemmende Wirkung der Metalle spezifischen Reaktionsmechanismen und Parameter bestimmen und quantifizieren.

Da eine experimentelle Methodik zur Durchführung der Messungen bisher nicht vorlag, mußten teilweise zunächst geeignete Meßverfahren entwickelt und einige Standardmeßverfahren der Mikrobiologie auf ihre Zuverlässigkeit und Genauigkeit hin überprüft werden.

Da sich bei den einzelnen Messungen aufgrund nicht beherrschbarer Anfangsbedingungen statistische Unterschiede in den Meßergebnissen zeigen, wurden die einzelnen Messungen jeweils mehrfach (2 bis 10mal) durchgeführt. Die Analyse der Ergebnisse zeigte, daß eine größere Anzahl von Messungen nicht erforderlich ist.

3.3.1 Wachstumsbestimmung

Wichtigste Voraussetzung für die Erfassung und Analyse metallischer Einflüsse auf Bakterien- und Gewebekulturen ist die genaue Bestimmung von Zellwachstum und -vermehrung. Neben der kontinuierlichen Erfassung der Zell- oder Bakterienzahlen einer unter genau definierten Versuchsbedingungen

gezüchteten Population sowie der Selektion nach lebenden und abgestorbenen Zellen ist eine dem Problem angepasste Auswertung erforderlich, wie sie in ihren Grundlagen bereits bei der Entwicklung des dynamischen Wachstumsmodells (Kap. 2.1.2) beschrieben wurde.

3.3.1.1 Qualitative und quantitative Bestimmung der Hemmung

Die oligodynamische Wirkung der Metalle auf Bakterien läßt sich qualitativ im Agardiffusionstest nachweisen. Hierbei werden die metallischen Proben auf bakteriell beimpfte Nährplatten gelegt und 24 Stunden lang bei 37°C bebrütet. Bei Auftreten einer Hemmzone in der Umgebung der Probe kann auf die wachstumshemmende Wirkung des Metalls geschlossen werden (Abb. 3.2).



Abb. 3.2 Agardiffusionstest bei Anwesenheit von toxisch wirkendem Kupfer in einer Staphylokokkenkultur. Der in Bildmitte befindliche, scheibenförmige Metallkörper ist von einer deutlichen Wachstumshemmzone umgeben.

Da in Fibroblastenkulturen die Zellen nur am Boden des Gefäßes anwachsen, prinzipiell also die gleiche Verteilung aufweisen wie Bakterien im Agardiffusionstest, kann die qualitative Beurteilung der abtötenden Wirkung genauso erfolgen wie bei Bakterien. In die Gewebekultur wird eine sterile Metallprobe gebracht; aus der Morphologie der Zellen, ihrem Wachstum oder der Vermehrung kann auf die Toxizität des Metalls geschlossen werden (Abb. 3.3).

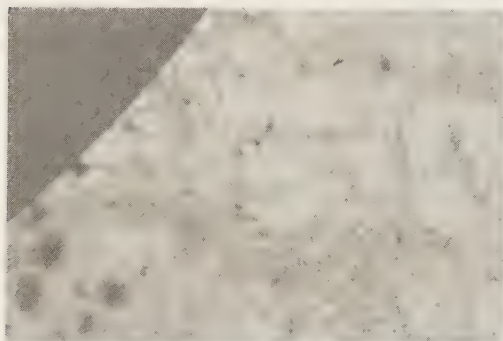


Abb. 3.3 Wachstumshemmende bzw. gewebezerstörende Wirkung von metallischem Kupfer in einer Fibroblastenkultur. In den hellen Bereichen wurden die Zellen unter Einfluß des Metalls abgetötet. Infolge der Diffusion der Metallionen breitet sich die Hemmzone im Verlauf der Zeit immer weiter aus.

Eine Aussage über die Stärke der hemmenden Wirkung eines Metalls läßt sich aus diesen qualitativen Tests nicht ableiten, sodaß außer einer Selektion nach toxischen oder verträglichen Materialien keine weitergehenden Erkenntnisse gewonnen werden können.

Zur quantitativen Bestimmung des mikrobiellen Wachstums sind aus der Literatur eine Reihe verschiedener Methoden bekannt (Stärka, 1968):

1. Lebendkeimzahlbestimmung durch Auszählung der Kolonien auf Agarplatten
2. Direktzählung der Mikroorganismen mit Hilfe des Mikroskops
3. Bestimmung der Trockensubstanz
4. Bestimmung des Gesamtstickstoffs in der Trockensubstanz (Bei den meisten Bakterien macht der Stickstoff 14% der Trockensubstanz aus)
5. Messung der Nährlösungs-Impedanz zur Bestimmung des Bakterienwachstums
6. Trübungsmessung (Bestimmung der Bakterienzahl aus der Lichtabsorption der Kultur)

Aussagen über die Zuverlässigkeit und Genauigkeit der einzelnen Verfahren, aus denen die Anwendbarkeit zur Lösung der vorliegenden Problemstellung hätte beurteilt werden können, lagen jedoch bisher nicht vor, sodaß zunächst die verschiedenen Verfahren auf ihre Eignung hin überprüft werden mußten.

Die Lebendkeimzahlbestimmung auf Agarplatten stellt die bisher am häufigsten angewandte Methode zur Bestimmung des mikrobiellen Wachstums dar. Hierbei wird das flüssige Nährmedium (TSB und NaCl) mit einer definierten Anzahl Bakterien beimpft und sofort mit dem zu testenden Metall kontaktiert. Nach entsprechenden Einwirkungszeiten werden Proben davon auf Agar-Platten ausgestrichen. Nach Bebrüten der Platten werden die gewachsenen Kolonien ausgezählt (=Koloniezahlbestimmung).

Die in der Literatur (Hause et al, 1981) erwähnte Impedanzmessung erwies sich als nicht geeignet zur Registrierung der Bakterienzahl, da ihre Schwankungen sowohl in Real- als auch Imaginärteil zu hoch sind, um zuverlässige Aussagen machen zu können.

Die Methode der Direktzählung unter dem Mikroskop eignet sich zwar prinzipiell zur Wachstumsbestimmung, setzt jedoch voraus, daß der Kultur jeweils Proben entnommen und ausgezählt werden. Ebenso wie die Bestimmung der Trockensubstanz und die Messung des Stickstoffgehalts leidet dieses Verfahren unter dem Nachteil, daß eine kontinuierliche Wachstumsregistrierung nicht möglich ist.

Den Wachstumsprozess von Bakterienkulturen kontinuierlich und mit einer hohen Zuverlässigkeit zu registrieren, ist prinzipiell mittels Photometrie realisierbar (Stanier et al, 1980). Hierbei wird die von Monod 1942 festgestellte Tatsache zugrunde gelegt, daß die optische Dichte der Bakterienkultur der Zellmasse proportional ist. Dabei beeinflußt die Veränderung der Größe der Zellen die Proportionalität nicht, obwohl dem eigentlichen Teilungsvorgang eine Volumenzunahme der Zelle und die Verdopplung der Kernäquivalente vorausgeht, solange asynchrones Wachstum vorliegt.

Das photometrische Verfahren zur Wachstumsbestimmung wurde bisher jedoch kaum angewandt, weil es primär nur Aufschluß über die Gesamtzahl, d.h. die Summe der lebenden und toten Bakterien gibt. Für eine genaue Analyse des bakteriellen Wachstums interessiert jedoch die Zahl der lebenden d.h. der vermehrungsfähigen Zellen.

Mit Hilfe des in Abschnitt 2.1.2 entwickelten Verfahrens ist es möglich, aus der Gesamtzahl der Bakterien die Anzahl der lebenden Zellen zu registrieren. Deshalb konnte bei der Durchführung der vorliegenden Untersuchungen erstmals das qualitativ hochwertige Verfahren der photometrischen Wachstumsbestimmung eingesetzt werden. Alle diese Messungen erfolgen unter den folgenden drei Voraussetzungen, die jedoch keine Einschränkung der Ergebnisse bedeuten:

1. Es liegt eine homogene flüssige Kultur von Mikroorganismen vor, und zwar einer einzigen Gattung.
2. Die Temperatur der Nährlösung wird konstant gehalten.

3. Es erfolgt keine genetische Veränderung der Bakterien, z.B. entstehen keine Mutanten, und es erfolgt keine Umschaltung vom aeroben zum anaeroben Stoffwechsel.

3.3.1.2 Photometrische Wachstumsbestimmung

Die Bestimmung der Bakterienzahl durch Messung der optischen Dichte ist in Absorption möglich. Die Intensität einer in ein absorbierendes Medium, eine Bakteriensuspension, eindringenden monochromatischen Strahlung (sichtbares Licht oder IR-Strahlung) nimmt mit der Eindringtiefe x ab.

Für vernachlässigbare Streuung und kleine Konzentrationen des gelösten Stoffes gilt das Lambert-Beersche Gesetz:

$$(3.1) \quad \frac{I}{I_0} = \exp (-K_c \cdot c \cdot d)$$

Dieses Gesetz besagt, daß die Dämpfung des Lichtstromes in einer Lösung von der Anzahl der absorbierenden Teilchen abhängig ist.

Durch Messung der Lichtintensitäten I und I_0 , d.h. mit und ohne bakterielle Absorption, läßt sich daraus unter Kenntnis der Absorptionsstrecke d nach experimenteller Bestimmung der molekularen Extinktionskonstanten K_c die Konzentration der Bakterienkultur ermitteln.

Wichtig für die Wahl einer geeigneten Wellenlänge ist, daß zwischen dem Logarithmus der Absorption und der Zellmasse eine lineare Abhängigkeit besteht, das Lambert-Beersche Gesetz also erfüllt bleibt.

Aus Abb. 3.4 geht deutlich hervor, daß die Proportionalität

$$\ln \frac{I}{I_0} \sim c \cdot d$$

nur bei niedrigen Absorptionswerten gilt, und daß bei

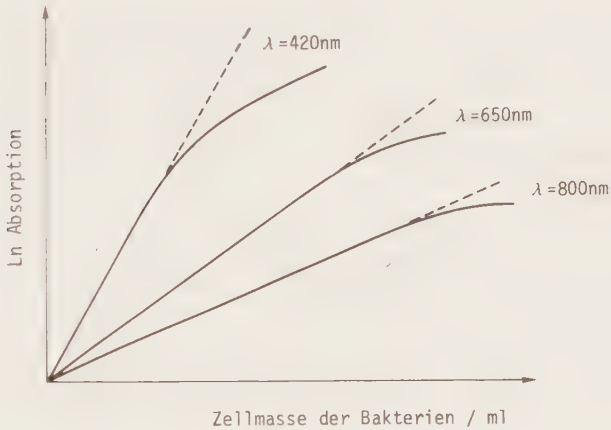


Abb. 3.4 Lichtabsorption von Bakterien bei verschiedenen Wellenlängen. Modifiziert nach Stanier

höheren Wellenlängen die Proportionalität über einen weiteren Bereich der bakteriellen Zellmasse erhalten bleibt. Die strenge Proportionalität zwischen der Bakteriendichte und der Absorption des eingestrahltten Lichtes nach dem Lambert-Beerschen Gesetz gilt nur, solange keine gegenseitige Beeinflussung auftritt, d.h. bei niedrigen Konzentrationen der bakteriellen Zellmasse. Der lineare Bereich (Abb. 3.4) ist abhängig von der Wellenlänge und der Zell-

dichte, nicht jedoch von der Länge der absorbierenden Strecke. Im Interesse einer einfachen Auswertbarkeit der experimentellen Ergebnisse ist die Wellenlänge so zu wählen, daß bei der im Experiment zu erwartenden Zelldichte ein linearer Zusammenhang erhalten bleibt.

Ein weiteres Auswahlkriterium ist es, die Wellenlänge der Cytochromabsorptionsbanden (Stanier et al, 1980) zu vermeiden, da sich diese in Abhängigkeit vom bakteriellen Stoffwechsel verschieben und damit eine nicht vorhandene Variation der Bakterienzahl vortäuschen können.

Tab. 3.3

Absorptionsbänder von Cytochrom c bei unterschiedlichen Bakterien (Wellenlängen in nm).

	Bänder				Bän- der	Soret Bänder
Bacillus subtilis	604	-	-	564	552	523 422
Pseudomonas aeruginosa	-	-	-	560	552	530 428
Escherichia coli	628	-	592	560	-	530 430
Proteus vulgaris	630	-	595	560	-	533 430

Aus Tab. 3.3 geht hervor, daß sich zur photometrischen Bestimmung der Wachstumskinetik der Bakterien eine im Infraroten ($\lambda > 700$ nm) liegende Wellenlänge empfiehlt. Dies

bestätigt nach Abb. 3.5

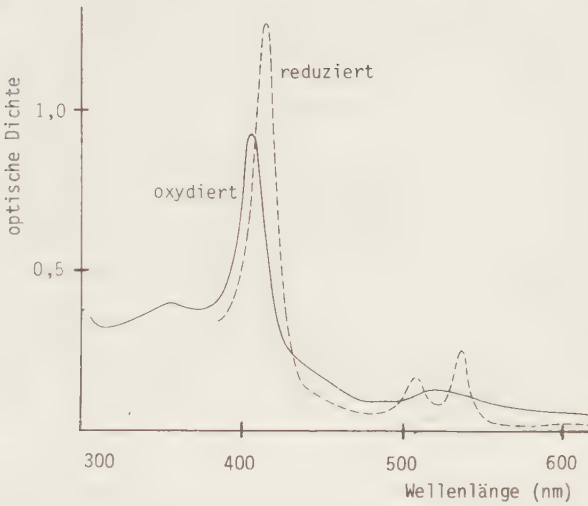


Abb. 3.5 Das Absorptionsspektrum von Cytochrom c. Modifiziert nach Stanier

Zur Durchführung der photometrischen Bestimmung der Bakterienzahl wurde der in Abb. 3.6 angegebene Versuchsaufbau gewählt.

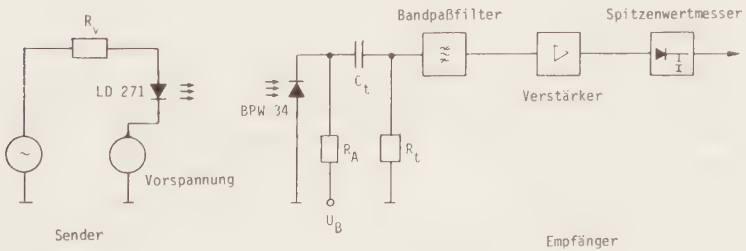


Abb. 3.6 Blockschaltbild der optischen Absorptionsmessung, wie sie für diese Versuchsdurchführung entwickelt wurde.

Die photometrische Messung wird mit einer optischen Lichtschranke durchgeführt. Zur Vermeidung von Meßfehlern, die durch Hintergrundstrahlung (Tageslicht, künstliche Beleuchtung) hervorgerufen werden können, wird die Lichtintensität der optischen Schranke moduliert.

Ausreichende Störsicherheit ist gegeben, wenn der Sender mit einer Frequenz $f > 10$ kHz moduliert wird und der Empfänger nur eine geringe Bandbreite aufweist.

Bei der hier verwendeten Versuchsanordnung (Abb. 3.6) wurde eine GaAs-Lumineszenzdiode (Infrarot-Strahler $\lambda = 800$ nm) als Lichtquelle benutzt. Die Senderschaltung besteht aus einem Oszillator, der die Modulationsfrequenz generiert, einer Gleichspannungsquelle, die zusammen mit dem Vorwiderstand R_v zur Einstellung des Arbeitspunktes dient, und der Leuchtdiode selbst.

Zum Empfang der IR-Strahlung dient eine in ihrer spektralen Empfindlichkeit auf die Lumineszenzdiode angepaßte Photodiode. Das durch die einfallende Strahlung generierte elektrische Signal wird selektiv gefiltert, sodaß nur diejenigen Komponenten des Signals, die vom Sender herrühren, zur Auswertung herangezogen werden. Nach einer Signalverstärkung wird der Spitzenwert des sinusförmigen Empfangssignals bestimmt, der nach einer Tiefpaßfilterung (Glättung) am Ausgang der Schaltung zur Verfügung steht.

Zur Bestimmung der Bakterienzahl ist nach dem Lambert-Beerschen Gesetz (3.1) die Messung sowohl der durch die Bakterien abgeschwächten Lichtintensität, als auch derjenigen des ungedämpften Lichtstrahls erforderlich. Die Intensität des ausgestrahlten Lichts muß während der Messung konstant bleiben.

Bei üblichen Spektralphotometern, die zur Durchführung dieser Messungen benutzt werden, wird hierzu der Lichtstrahl mittels Spiegeln in zwei Strahlen aufgespalten, wobei der eine das absorbierende Medium durchläuft, der zweite ungedämpft zum Empfänger gelangt. Dadurch ist das Verhältnis

der Intensitäten I/I_0 kontinuierlich bestimmbar, außerdem ist die Messung unempfindlich gegen langsame Schwankungen der Lichtintensität des Senders und zeitliche Veränderungen der Empfangscharakteristik der Photozellen.

Bei Benutzung hochstabiler Sender und Empfänger lassen sich die Drifteffekte soweit verringern, daß sie gegen die Meßsignale vernachlässigbar sind*. Unter Verzicht auf eine Aufspaltung des Strahlengangs kann dann die zu Beginn des Experiments bestimmte Anfangsintensität I_0 des bakterienfreien Nährmediums als Eichwert zur weiteren Durchführung des Experiments benutzt werden. Durch die Bestimmung des Verhältnisses zwischen der ursprünglichen Lichtintensität und der jeweiligen Momentanintensität kann die zugehörige Bakterienzahldichte bestimmt werden.

Nachteilig für die praktische Durchführung und Auswertung der Messungen wirkt sich aus, daß jeweils die Extinktionskonstante und die Absorptionsstrecke des Lichts bekannt sein müssen. Ist I_0 die Lichtintensität bei bakterienfreiem Substrat und I_1 die Intensität bei bekannter Bakterienzahldichte c_1 , dann bestimmt sich das Produkt K von Extinktionskonstante und Absorptionsstrecke aus dem Lambert-Beerschen Gesetz (Gl. 3.1) zu:

$$(3.2) \quad K = K_c \cdot d = - \frac{\ln I_1/I_0}{c_1}$$

Nach Gl. 3.1 ist Bakterienzahldichte zu irgendeiner Zeit t in Abhängigkeit von der Intensität $I(t)$:

$$(3.3) \quad c(t) = - \frac{\ln I(t)/I_0}{K}$$

Durch Einsetzen von Gl. 3.2 in Gl. 3.3 ergibt sich:

$$(3.4) \quad c(t) = \frac{\ln I(t)/I_0}{\ln I_1/I_0} \cdot c_1$$

*Die Intensität schwankt um weniger als 0,2% über die Zeitdauer der einzelnen Experimente von 30h.

Wird $I_0=1$ gewählt, dann vereinfacht sich Gl. 3.4 zu:

$$(3.5) \quad c(t) = \frac{\ln I(t)}{\ln I_1} \cdot c_1$$

Ist demnach die Bakterienzahldichte c_1 zu Beginn der Messung bekannt, dann kann sie kontinuierlich bestimmt werden, ohne daß die Absorptionsstrecke bekannt ist. Für die praktische Durchführung weist diese Relativmessung den Vorteil auf, daß alle Messungen, ohne Rücksicht auf die unterschiedlichen Extinktionskoeffizienten der einzelnen Bakterienarten, stets nach dem gleichen Schema durchgeführt und ohne die Verwendung unterschiedlicher Konstanten ausgewertet werden können, was bei der automatischen Auswertung besonders günstig ist. Dabei können die Messungen ohne spezielle Aufbauten, auch in Gefäßen unterschiedlicher Absorptionsstrecken ohne vorherige Eichung durchgeführt werden. In Anbetracht der großen Anzahl, auch parallel laufender Experimente kann damit der erforderliche apparative Aufwand erheblich reduziert werden. Die Bestimmung der Bakterienzahldichte zu Beginn des Experiments, die hier zur weiteren Vereinfachung stets gleich gewählt wurde, erfolgt durch Trübungsvergleich mit einer Referenzprobe (Trübungsstandard Mc Farland). Hierzu wird einer Kultur hoher Bakteriendichte so lange Nährlösung zugegeben, bis sie die gleiche Lichtabsorption aufweist wie die Referenzprobe.

3.3.1.3 Messungen an Gewebekulturen

Neben der antimikrobiellen Wirkung sind die stoffwechselhemmenden Eigenschaften der Metalle beim Kontakt mit menschlichen Zellen von besonderer Bedeutung, da bei Implantaten, wie z.B. künstlichen Prothesen, der Werkstoff in direktem Kontakt zu den Zellen steht.

Ziel der Messungen bei Zellkulturen war es, zu überprüfen, ob die phänomenologischen Ergebnisse der Oligodynamie bei Bakterienkulturen auf Fibroblasten direkt übertragbar sind, also die gleichen Mechanismen vorliegen. Hierzu mußte untersucht werden, ob sich die gleiche Reihenfolge der Wirksamkeiten der Metalle, wie man sie bei Bakterien antrifft, auch bei Fibroblasten bestätigt, und zwar sowohl bei metallischen Festkörpern als auch bei gelösten Salzen unterschiedlicher Konzentrationen.

Zur Untersuchung der Gewebeverträglichkeit wurde zunächst überprüft, ob die bei Bakterienkulturen angewandten Meßverfahren und Modelle auf kultivierte Zellen übertragbar sind. Es zeigte sich, daß die meisten Messungen bei Gewebekulturen schwieriger durchführbar sind, als bei Bakterien. Während die pH-Wert- und Potentialbestimmung nur hinsichtlich der Sterilität der Meßelektroden Schwierigkeiten bereitet, treten bei der Wachstumsbestimmung bereits meßtechnische Probleme auf.

Anders als bei Bakterien, liegt bei Gewebekulturen keine homogene Suspension vor. Vielmehr wachsen die Zellen am Boden des Kulturgefäßes an. Die Anzahl der Zellen einer Population ist um Größenordnungen kleiner als bei Mikroorganismen. Wegen der entsprechend geringeren optischen Dichte der Zellmasse ist eine einfache Anordnung zur photometrischen Wachstumsmessung zu unempfindlich. Verbesserungen können erzielt werden durch Benutzung von aufwendigeren Verfahren, die z.B. Totalreflexion oder Vielfachreflexion ausnutzen.

Prinzipiell ist bei einer derartigen Messung die bereits für Bakterien beschriebene Methodik auch zur Analyse der Wachstumsparameter von Fibroblastenkulturen anwendbar. Aufgrund der üblichen Versuchsbedingungen kann man jedoch bei Zellkulturen im Gegensatz zu Bakterienkulturen nicht immer von der Voraussetzung asynchronen Wachstums ausgehen. Dies hat natürlich Auswirkungen auf die Populationsstatistik zur Folge, sodaß Messungen der Zellzahl mittels Lichtabsorption durch das annähernd synchrone Längenwachstum der Zellen beeinflußt werden können. Nur bei asynchronem Wachstum, bei dem eine Gleichverteilung der Zellgrößen in der Population gewährleistet ist, stellt sich ein konstanter, von der momentanen Größe der Einzelzellen unabhängiger Extinktionskoeffizient ein, der der über die Zellgröße gemittelten Absorption entspricht. Da das Größenwachstum der Zellen in der vorliegenden Arbeit nicht analysiert wurde, bezieht sich im folgenden der Ausdruck Wachstum stets auf die Population, d.h. die Zellvermehrung.

Zur qualitativen Beurteilung der toxischen Wirkung eines Metalls eignet sich neben der Bestimmung der Wachstumsrate auch die einfacher durchzuführende Beobachtung der Morphologie der Zellen, da bei einer Schädigung signifikante Strukturänderungen des Gewebes festzustellen sind.

Anzeichen für das Auftreten oligodynamischer Effekte lassen sich auch bereits aus der Farbänderung eines pH-Indikators entnehmen, der dem Substrat MEM (Minimal Essential Medium) beigelegt ist.

Zuverlässige quantitative Aussagen über die hemmende Wirkung eines Metalls können jedoch weder aus der Beobachtung der Morphologie noch aus der pH-Wertmessung abgeleitet werden.

Da die photometrische Wachstumsbestimmung aus den zuvor bereits genannten Gründen bei den vorliegenden Untersu-

chungen nicht zur Anwendung kommen konnte, bot sich zur quantitativen Bestimmung der Wachstumsdynamik von Fibroblasten die Methode der Auszählung unter dem Mikroskop an.

Die einzelnen Zellen einer Kultur sind nur sehr schwer gegeneinander abgrenzbar (Abb. 3.1a), sodaß eine zuverlässige Zellzahlbestimmung nur möglich ist, wenn die Kultur zuvor durch Trypsinierung suspendiert, eine Probe entnommen und auf einem Objektträger ausgestrichen wird. Hierdurch wird eine Trennung der einzelnen Zellen erreicht (Abb. 3.1b). Dieses Verfahren der quantitativen Wachstumsbestimmung von Fibroblasten ist zwar einfach in der Durchführung, weist aber den wesentlichen Nachteil auf, daß die Kultur durch die Messung in ihrem Wachstum unterbrochen wird, sodaß bei jeder Kultur nur einmal eine Auszählung vorgenommen werden kann. Der experimentelle Aufwand zur Bestimmung der Wachstumskinetik wird dadurch sehr groß.

Zur Unterdrückung des Einflusses statistischer Streuungen der Ergebnisse, die dadurch entstehen, daß die Anfangsbedingungen der Kulturen nie absolut gleich sind, wird die Zahl der erforderlichen Experimente weiter erhöht.

Zur Bestimmung der hemmenden Wirkung metallischer Festkörper wurden entsprechende Proben in Fibroblastenkulturen gegeben, die 24h zuvor ausgesät worden waren. Die Auszählung der Zelldichte erfolgte jeweils 48h nach Zugabe der metallischen Proben.

Bei der Untersuchung der Wachstumskinetik von Mikroorganismen wurde zur Beschreibung der hemmenden Wirkung der Metalle das Verhältnis von Wachstums- und Absterberate analysiert. Da eine gezielte Messung der Stoffwechselfunktion einer einzelnen Bakterie kaum möglich ist, wurde ihr Tod als irreversibler Verlust der Reproduzierbarkeit definiert. Hierbei konnte nicht festgestellt werden, ob der Einfluß der Metallionen tatsächlich zu einem

Zusammenbruch des Stoffwechsels führt, oder ob lediglich die Fähigkeit zur Zellteilung verloren geht. Anders als bei den Mikroorganismen ist es bei Fibroblasten möglich, durch die Messung des Membranpotentials mit Hilfe von Mikroelektroden (AgCl/KCl gegen AgCl) gezielt an einer einzelnen Zelle zu registrieren, ob die Stoffwechselfunktionen der Zelle noch aufrechterhalten bzw. reduziert sind (Abb.3.7).

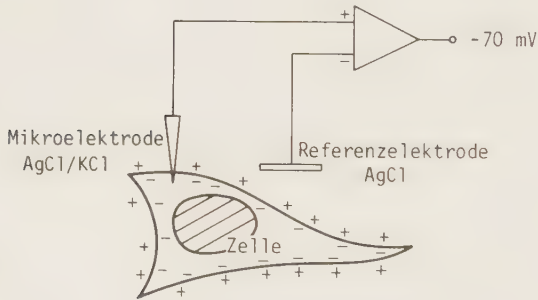


Abb. 3.7 Messung des Zellpotentials von Fibroblasten mit einer Mikroelektrode

3.3.2 Einfluß metallischer Oberflächen auf das Wachstum der Bakterien

Ein wesentliches Ziel dieser Arbeit war es, die oligodynamischen Wirkungsmechanismen bei Metallen aufzuklären. Da in fast allen bisher publizierten Untersuchungen (Bundy et al, 1980; Nakamuva, 1962) das Metall in fester Form mit den

Bakterien oder kultivierten Zellen in Kontakt gebracht wurde, lag zunächst die Vermutung nahe, daß die Wechselwirkung zwischen Mikroorganismen und metallischem Festkörper für die antimikrobielle Wirkung der Metalle von Bedeutung sein könnte, daß möglicherweise sogar eine bakterielle Korrosion wesentlicher Bestandteil der oligodynamischen Wirkungsmechanismen sei. Zur Überprüfung dieser These wurden drei Experimente durchgeführt.

Zunächst wurde einer Bakteriensuspension bestehend aus einem Gemisch physiologischer Kochsalzlösung und Tryptic-Soy-Bouillon (27 ml) und einer Konzentration von $1,5 \times 10^7$ Salmonella typhi-murium pro ml das zu untersuchende Metall (Cu) in Form eines Festkörpers zugegeben.

Im zweiten Versuch (Abb. 3.8) wurde das Metall bei sonst

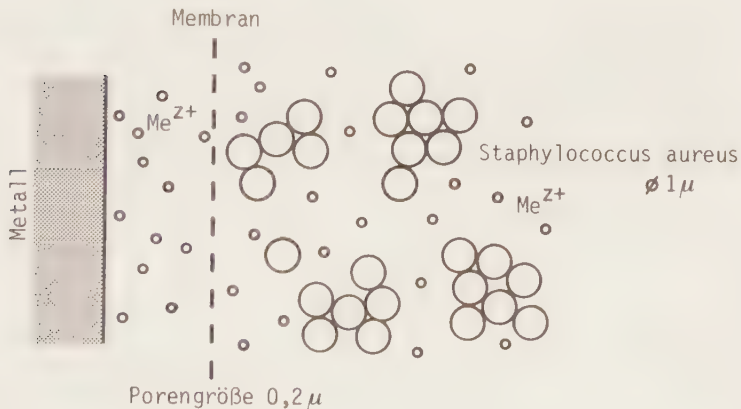


Abb. 3.8 Versuchsaufbau zur Bestimmung der keimtötenden Wirkung von Metallen bei Trennung von Bakterien und metallischem Festkörper durch eine für Metallionen durchlässige, für Bakterien aber undurchlässige Membran

gleichen Bedingungen von einem Bakterienfilter umgeben,

dessen Porengröße ($0,2 \mu$) sicherstellte, daß einerseits für die Diffusion der in Lösung gehenden Metallionen kein Hindernis bestand, andererseits aber die Bakterien vom Metall ferngehalten wurden, was eine direkte Wechselwirkung also ausschloß.

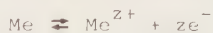
Im dritten Experiment wurden der Suspension gelöste Metallionen zugegeben, und zwar in einer Konzentration, die derjenigen entspricht, die sich in den ersten beiden Versuchen durch die Auflösung des Metalls einstellt. Dies bereitete jedoch insofern Schwierigkeiten, als sich die Konzentration gelöster Metallionen bei Anwesenheit eines Festkörpers im Substrat im Verlauf der einzelnen Wachstumsphasen aufgrund der eintretenden pH-Wertverschiebung ändert (vgl. Kap. 5.5). Überdies werden bei dem näherungsweise vorherrschenden thermodynamischen Gleichgewicht der Phasengrenze Metall-Substrat diejenigen Metallionen, die von den Zellen fest gebunden werden, ständig in die Lösung nachgeliefert. Um möglichst zuverlässige Vergleichswerte aus den Messungen zu erhalten, beschränkte sich die Analyse des Wachstums auf die exponentielle Phase. Es wurde diejenige Metallionenkonzentration eingestellt, die dem aus Abb. 5.12 zu entnehmenden mittleren Wert während der exponentiellen Phase (10^{-9} Mol/l) entspricht. Alle Messungen wurden bei der gleichen Temperatur von 37°C durchgeführt.

3.3.3 Löslichkeit von Metallen

Zu Beginn der Experimente stellte sich die Frage, mit welchen experimentellen Methoden die Konzentration der in den Substraten gelösten Metallionen bestimmt werden könnten. Übliche Verfahren, wie z.B. Atomabsorptionspektroskopie sind bei Bakterienkulturen für eine kontinuierliche Registrierung der Ionenkonzentrationen nicht geeignet. Aus diesem Grund wurde eine Methode entwickelt, bei der durch eine kontinuierliche Potentialmessung der Metallelektrode die Konzentration der gelösten Ionen bestimmt werden konnte.

3.3.3.1 Potentiometrische Konzentrationsbestimmung

Im Augenblick des Eintauchens eines metallischen Festkörpers in ein Substrat herrscht i.a. kein elektrochemisches Gleichgewicht, sodaß eine Ausgleichsreaktion abläuft. Je nach den herrschenden energetischen Verhältnissen handelt es sich hierbei entweder um die Auflösungs- oder Abscheidungsreaktion des Metalls. Das elektrochemische Gleichgewicht läßt sich genauso wie jeder chemische Gleichgewichtszustand als ein dynamisches Gleichgewicht auffassen, d.h. an der Phasengrenze laufen Metallauflösung und Metallabscheidung gleich schnell ab.



Das System läßt sich mit Hilfe seiner freien Enthalpie beschreiben. Im Gleichgewichtszustand gilt:

$$(3.6) \quad \Delta G^0 = -RT \ln K \quad \text{mit} \quad K = \frac{a_{\text{ox}}}{a_{\text{red}}} = \frac{a_{\text{Me}^{z+}}}{a_{\text{Me}}}$$

Je negativer ΔG^0 ist, desto besser ist das Metall in dem Elektrolyten löslich. Die logarithmische Abhängigkeit des Löslichkeitsprodukts von ΔG^0 besagt, daß das Löslichkeits-

produkt durch relativ geringe Veränderungen von ΔG^0 stark beeinflussbar ist. Das System Elektrode-Elektrolyt stellt ein Redoxsystem dar, das sich auch mit Hilfe des elektrischen Potentials der Elektrode beschreiben läßt. Mit den in Kap. 2.2.2 dargelegten Einschränkungen gilt für die aktive Metallelektrode:

$$(3.7) \quad \Delta \varphi = \varphi_0 + \frac{RT}{zF} \ln \frac{a_{\text{ox}}}{a_{\text{red}}} = \varphi_0 + \frac{RT}{zF} \ln \frac{a_{\text{Me}^{z+}}}{a_{\text{Me}}}$$

Die Aktivitäts- bzw. Konzentrationsabhängigkeit der Redoxpotentiale ermöglicht es, die Konzentration gelöster Ionen durch Messung des Potentials einer Elektrode des gleichen Metalls zu bestimmen. Für die Konzentration an gelöstem Metall ergibt sich mit $a_{\text{Me}}=1$ (vgl. Kap. 2.2.2) und $a_{\text{Me}^{z+}} = c_{\text{Me}^{z+}}$

$$(3.8) \quad c_{\text{Me}^{z+}} = \exp \left(\frac{\Delta \varphi - \varphi_0}{RT} \cdot zF \right)$$

Wegen der exponentiellen Abhängigkeit von der Spannung kann die Konzentration über den gesamten Bereich der Löslichkeiten bis hin zu sehr geringen Werten durch Bestimmung des Potentials in einem relativ kleinen Bereich (+3V bis -3V) bestimmt werden.

Als Referenzelektrode diente bei der Messung der Potentiale zur Konzentrationsbestimmung der gelösten Metallionen eine gesättigte Kalomelektrode (GKE, Potential gegen Normal-Wasserstoffelektrode NHE gleich +241,5 mV), als Meßelektrode die unterschiedlichen Metalle selbst: Kupfer, Titan, Messing, Stahl AISI 316L und MP 35N. Dementsprechend ist auch das Normalpotential φ_0 in Gl. 3.7, das den üblichen Tabellen (Weast, 1971) entnommen werden kann, auf das Bezugspotential der Kalomelektrode umzurechnen. Zur Vermeidung von Elektrodenüberspannungen wurde ein sehr hochohmiger Meßverstärker zum Messen der Potentiale benutzt.

Bei den in Kap. 5.4 dargestellten Experimenten zur Konzentrationsbestimmung aus den Elektrodenpotentialen wurden aktive Kupferelektroden verwandt. Es gilt also Gl. 3.8. Die potentiometrische Konzentrationsbestimmung von Titan, Messing und Stahl setzt die Modifizierung der Gleichung entsprechend den speziellen Elektrodenreaktionen voraus.

3.3.3.2 pH-Wert-Abhängigkeit von Stoffwechsel und Metall- ionenkonzentration

Neben der direkten Auswertung der Wachstumsmessungen einer Kultur läßt sich der Verlauf des pH-Werts des Nährmediums als weiteres Kriterium zur Beurteilung der Stärke der oligodynamischen Wirkung heranziehen.

Die Wasserstoffionenkonzentration ist neben der Temperatur, die aber bei den vorliegenden Versuchen konstant bei 37°C gehalten wurde, der wichtigste physikalische Faktor, der die Lebensaktivität der Mikroorganismen beeinflußt.

Eine stoffwechselbedingte Ansäuerung des Mediums trifft man nicht nur bei Bakterien- und Gewebeexperimenten an, sondern auch in vivo tritt bei menschlichem Gewebe eine entzündungsbedingte pH-Wert-Verschiebung zum Säuren auf, sobald es - um auf das in der Einleitung gegebene Beispiel zurückzukommen - bei offenen Implantaten zu eitrigen Einschmelzungen mit Ausbildung von Granulationsgewebe in der Umgebung und schließlich zur Fistelbildung kommt.

pH-Wert und Wachstum korrelieren über die Säure-Base-Produktion des Stoffwechsels miteinander. Da die Säureproduktion in einer Bakterienkultur neben anderen Parametern der Zahl der lebenden Bakterien B_1 proportional ist, wurde hieraus für jeweils kleine Intervalle der pH-Wert-Kurve näherungsweise gefolgert:

$$\frac{\delta H^+}{\delta t} \sim v \cdot B_1(t)$$

v gibt die kumulative Geschwindigkeit für den Ablauf des bakteriellen Stoffwechsels an. Durch Messung von pH-Wert und Bakterienzahl kann v bestimmt werden.

Der Säuregehalt des Substrats nimmt nicht nur Einfluß auf das Wachstum der Mikroorganismen, sondern auch auf die Löslichkeit der Metallelektrode, was sich in einer Änderung des Gleichgewichtspotentials, das sich im Kon-

takt mit der Nährlösung einstellt, ausdrückt.

Da die antimikrobielle Wirkung eines Metalls wesentlich von der Konzentration seiner im Substrat vorliegenden Ionen abhängig ist, und damit auch von der Säure-Base-Produktion der Mikroorganismen, wurde die pH-Wert Kurve mit einer Glaselektrode kontinuierlich registriert.

3.3.3.3 Spektroskopische Konzentrationsbestimmung

Atomabsorptionsspektroskopische Verfahren (Welz, 1975) können in Analogie zu der in Kap. 3.3.1.2 beschriebenen Methode der Bestimmung der Bakterienzahldichte einer Kultur dazu herangezogen werden, die Konzentration gelöster Metallionen in Proben des Substrats zu bestimmen. Hierzu ist es jedoch erforderlich eine Lichtquelle zu benutzen, deren Spektrum dazu geeignet ist, selektiv die Absorption eines einzigen Elements zu erfassen. Da die Absorptionslinien der Atome sehr schmal sind, empfiehlt sich eine Lichtquelle, die genau das Spektrum des zu bestimmenden Elements aussendet.

Bei der in Abb. 3.9 dargestellten Anordnung wird mit Hil-

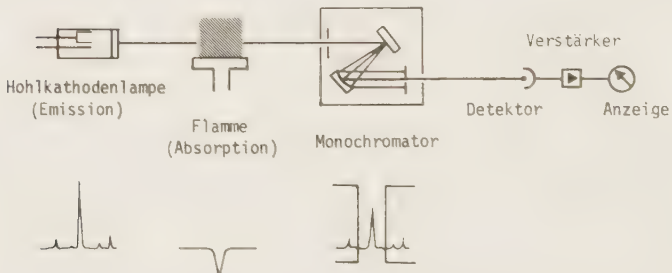


Abb. 3.9 Schematischer Aufbau eines Atomabsorptionsspektrometers. Modifiziert nach Welz

fe eines Monochromators bis auf eine Resonanzlinie das übrige Spektrum der Lichtquelle, die das gleiche Element, wie das zu untersuchende, zur Emission benutzt, ausgeblendet.

Zur thermischen Dissoziation der Probe wird eine Luft/Acetylen-Flamme benutzt. Sie bietet für zahlreiche Elemente eine für die Atomisierung ausreichende Temperatur, wobei nur in wenigen Fällen (Alkali-Metalle) eine merkliche Ionisation auftritt. Die Flamme ist über einen weiten Spektralbereich völlig transparent und zeigt erst unterhalb $2300 \text{ \AA}$ eine merkliche Eigenabsorption. Zudem ist die Emission der Luft/Acetylen-Flamme sehr gering, sodaß für viele Elemente die Bedingungen ideal sind.

Kupfer zählt zu den am leichtesten mittels Atomabsorptionsspektroskopie bestimmbaren Elementen. Die Meßwerte sind praktisch unabhängig von der Stöchiometrie der Flamme und vom Lampenstrom.

Kupfer weist eine Anzahl verschiedener Resonanzlinien auf, die sich alle analytisch gut verwenden lassen. Durch die Wahl der richtigen Resonanzlinien kann man auch hohe Kupfergehalte bestimmen, ohne die Probe stark verdünnen zu müssen. Für geringere Kupferkonzentrationen, wie sie hier vorlagen (in der Größenordnung von 10^{-8} bis 10^{-10} Mol/l) eignet sich am besten die $3247,5 \text{ \AA}$ -Linie.

Mit Hilfe der atomabsorptionsspektrometrischen Konzentrationsbestimmung für die Metallionen im Nährsubstrat wurde die Präzision der potentiometrischen und pH-Wert-abhängigen Konzentrationsbestimmung überprüft. Im Gegensatz zu den anderen beiden Verfahren läßt sich die Gesamtmenge des in der Probe enthaltenen Kupfers ermitteln, nicht jedoch die Aufteilung in Ionen unterschiedlicher Ladungszahlen, sodaß z.B. nur die Summe der 1- und 2fach geladenen Kupferionen, sowie der ungeladenen Kupferatome, die sich in Lösung befinden, erfaßt werden kann.

Für die Messungen wurde die Apparatur BECKMAN ATOMIC ABSORPTION SPECTROPHOTOMETER/1272M benutzt.

3.3.4 NMR - spektroskopische Strukturanalyse

Zur Klärung der Wirkungsmechanismen der Oligodynamie und zur Bestätigung der im folgenden Kapitel (Kap. 4) entwickelten Modellvorstellungen der Reaktion zwischen Metallionen und Proteinen wurde die Struktur der Metall-Cystein-Komplexe analysiert. Da in diesem Zusammenhang hauptsächlich interessiert, ob sich die Metallionen tatsächlich nur an die Sulfhydrylgruppe anlagern, bietet sich als Methode der Wahl für die Strukturanalyse die kernmagnetische Resonanzspektroskopie (Bergmann et al, 1981) an.

3.3.4.1 NMR-Apparatur

Zur Bestimmung des kernmagnetischen Resonanzspektrums wird die zu untersuchende Probe einem magnetischen Feld ausgesetzt, das sich zusammensetzt aus der Überlagerung des statischen Feldes eines Elektromagneten und des Wechselfeldes einer Spule, die Teil einer abgeglichenen HF-Brückenschaltung ist. Durch zusätzliche Modulationsspulen wird das statische Feld so variiert, daß der Resonanzbereich periodisch durchfahren wird (Magnetsweep). Sobald Resonanz eintritt, absorbiert die Probe Energie, d.h. die Brückenschaltung wird verstimmt und gibt eine Signalspannung ab, die über einen hochempfindlichen Resonanzverstärker der Y-Ablenkung eines Schreibers zugeführt wird. Die X-Ablenkung wird vom Magnetsweep angesteuert. Damit wird die Amplitude des Resonanzsignals als Funktion der magnetischen Feldstärke bei fester Frequenz des Wechselfeldes aufgezeichnet. Prinzipiell wäre es möglich, die Messung auch bei konstantem Magnetfeld und frequenzmo-

duliertem Wechselfeld durchzuführen. Da es jedoch technisch einfacher ist, frequenzstabile Sender zu bauen als konstante Magnetfelder zu erzeugen, wird dieses Verfahren in der Praxis kaum angewandt.

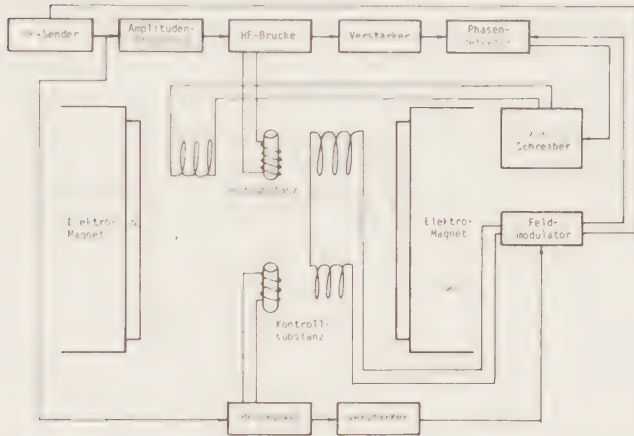


Abb. 3.10 Prinzipschaltbild eines NMR-Spektrometers
(vergleichbar JOEL YNM C60HL)

Zur Selbstregelung des KMR-Spektrometers (Abb. 3.10) wird eine Referenzprobe (z.B. Wasser) benutzt. Die magnetische Feldstärke des Elektromagneten wird so geregelt, daß das Resonanzsignal der Kontrollsubstanz stets maximal ist. Dazu dient der Kontrollempfänger mit seiner zugehörigen Brückenschaltung. Weicht das Signal von seinem Maximalwert ab, so wird zunächst das Magnetfeld und notfalls auch die Senderfrequenz so lange variiert, bis das Maximum wieder erreicht ist. Diese Maximaleinstellung erfolgt nicht permanent, sondern mit einer Wiederholfrequenz von 5 kHz. Dadurch wird das Resonanzsignal mit der gleichen Frequenz moduliert, was für die Praxis einen Vorteil darstellt, weil Wechselspannungssignale leichter verstärkt

werden können als Gleichspannungssignale. Ein Phasendetektor im Empfängerkreis ermöglicht es, die Messung sowohl in Absorption als auch in Dispersion durchzuführen. Die entsprechenden Signale unterscheiden sich nur durch ihre Phasenlage in bezug auf die eingestrahlte Frequenz voneinander, sie sind um 90° gegeneinander verschoben. Bei den vorliegenden Messungen betrug die Magnetfeldstärke etwa 15000 Gauß, dementsprechend lag die Sendefrequenz bei 60 MHz.

Für die Hilfe bei der Durchführung der Messungen am Institut für Anorganische Chemie danke ich Herrn Dr. Moll. Es wurde die Apparatur JOEL YNM C6OHL benutzt.

3.3.4.2 Die chemische Verschiebung

Die Resonanzfrequenz eines Kerns wird bei festem äußerem Magnetfeld durch seinen Bindungszustand beeinflusst. Dieser Effekt ist darauf zurückzuführen, daß die Elektronenkonfiguration des Atoms eine charakteristische abschirmende Wirkung auf das Magnetfeld ausübt. Für das Eintreten der Resonanz ist die magnetische Feldstärke am Kern selbst maßgebend und nicht die äußere Feldstärke. Das äußere Magnetfeld beeinflusst die möglichen Bahnformen der Elek-

tronen dahingehend, daß die entstehenden Kreisströme das Magnetfeld am Orte des Kerns schwächen. Folglich tritt auch die Kernresonanz bei einer niedrigeren Frequenz ein. Die Frequenzverschiebung liegt in der Größenordnung von $\Delta f = 10^{-6}$, Verschiebungen unter 10^{-9} können noch nachgewiesen werden. Diese Änderung der Resonanzfrequenz wird als chemische Verschiebung bezeichnet.

Da die chemische Verschiebung charakteristisch ist für den Bildungszustand eines Atoms, kann sie zur Bestimmung der Struktur einer Verbindung benutzt werden. Hierzu wird das Resonanzspektrum der zu analysierenden Substanz aufgezeichnet. Die Intensität der einzelnen gemessenen Resonanzpeaks ist der Anzahl der vorliegenden chemisch äquivalenten Kerne direkt proportional. Zur Bestimmung der Zahl der in den einzelnen Gruppen vorliegenden Kerne ist wegen einiger linienverbreiternder Effekte (Relaxationszeiten, Bergmann et al, 1981) nicht die Amplitude der Resonanzsignale, sondern ihre Fläche auszuwerten. Da die Resonanzfrequenz der Kerne bei vorgegebenen Magnetfeld vom gyromagnetischen Verhältnis abhängig ist, kann mit Hilfe der Resonanzspektrometrie durch Wahl der Anregungsfrequenz gezielt der Bindungszustand eines Elements in einer chemischen Verschiebung ermittelt werden. Betrachtet man z.B. das Protonenspektrum von Cystein (Abb. 3.11), so findet

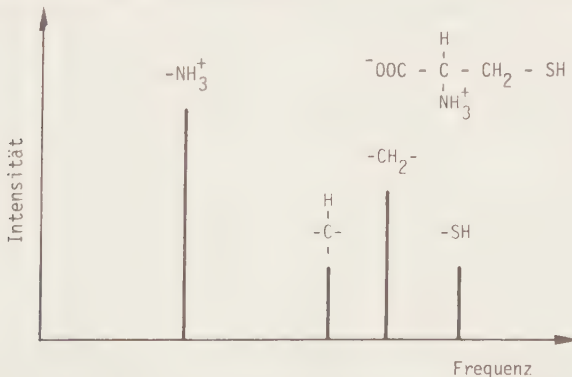


Abb. 3.11 Strichspektrum von Cystein bei Protonenresonanz. Die Strichhöhen stehen für die Intensität, d.h. die Fläche des Resonanzpeaks.

man 4 Resonanzlinien, deren Intensitäten sich verhalten wie 3:2:1:1, entsprechend der Anzahl der in den einzelnen Gruppen enthaltenen Protonen. Aus dem Spektrum ist ersichtlich, daß die Carboxylgruppe des Cystein sein Proton an die Aminogruppe abgibt, selbst also keine Protonenresonanz mehr aufweisen kann. Der Grad der Polarisierung hängt natürlich ab von den Lösungsbedingungen (Lösungsmittel, pH-Wert).

Da die Größe der chemischen Verschiebung der verwendeten magnetischen Feldstärke direkt proportional ist, sind die Meßwerte von zwei verschiedenen Apparaturen nur über Umrechnungen miteinander vergleichbar. Eine von der verwendeten Feldstärke unabhängige Maßzahl ergibt sich durch die folgende Definition:

$$\delta := \frac{\nu - \nu_s}{\nu_s}$$

Sie bezieht alle Messungen auf eine Standardsubstanz s , die den Nullpunkt der δ -Skala markiert. Meist verwendet man hierzu die Substanz Tetramethylsilan (TMS), die mit ihren zwölf äquivalent gebundenen Protonen nur ein einziges starkes Signal liefert. Bei allen Werten der chemischen Verschiebung in der dimensionslosen δ -Skala kommen Faktoren in der Größenordnung 10^{-6} vor, deshalb gibt man, um handlichere Zahlen zu erhalten, δ in ppm (parts per million) an.

4. Metall-Protein-Komplex

Die Schädigung von kultivierten Zellen und Bakterien erfolgt durch Wechselwirkung mit gelösten Metallionen. Das System Zelle, Nährmedium, gelöste Metallionen stellt sich sowohl thermodynamisch als auch chemisch sehr komplex dar. Deshalb ist die Beantwortung der Frage nach den speziell ablaufenden chemischen Reaktionen ein äußerst schwer zu lösendes Problem. Einerseits sind eine Menge verschiedener möglicher Reaktionstypen bekannt, da sie aber teilweise gleichzeitig ablaufen, ist es analytisch sehr schwierig festzustellen, welche Reaktionen wann und in welchem Maß ablaufen.

Durch Zugabe von Proteinen, speziell von Cystein, zum Nährsubstrat kann die stoffwechselhemmende Wirkung der Metalle verhindert oder reduziert werden. Dies läßt den Schluß zu, daß die Schädigung durch die Reaktion der Metallionen mit den Proteinen der Zellen verursacht wird. Die Beantwortung der Frage nach den speziell ablaufenden Reaktionen, die zur Denaturierung der Proteine führen, erfordert die Strukturanalyse der entstehenden Metall-Protein-Komplexe.

Proteine liegen im allgemeinen in einem dreidimensionalen Zustand vor, der durch intramolekulare kovalente Disulfidbrücken und durch eine Anzahl nichtkovalenter Bindungen, Ionenbindungen, hydrophobe Bindungen und Wasserstoffbrücken determiniert ist. Dieser Zustand wird als Tertiärstruktur des Eiweißes bezeichnet. Die Zerstörung der Tertiär eines Proteins durch Metalle wird als Denaturierung bezeichnet.

Neben dem Verlust an Löslichkeit verliert das Protein hierdurch seine Kristallisierbarkeit und seine biologische Aktivität, wie zum Beispiel seine enzymatische Eigenschaft. Die Schädigung eines einzelnen Fermentes in dem Stoffwechselsystem kann zum Ausfall ganzer Fermentketten führen. Da vor allem die Funktion der energieliefernden Fermentations und Atmungsketten mit von aktiven SH-Gruppen abhän-

gig ist, leitet deren Blockierung den Zusammenbruch des Energiestoffwechsels ein.

Bei der Metallauflösung im Nährmedium entsteht ein Konzentrationsgradient zum intrazellulären Raum hin, der einen Einwärtsstrom von Metallionen in die Zellen verursacht. Die Diffusionsgeschwindigkeit ist abhängig von der spezifischen Permeabilität der Zellmembran, was einer der Gründe ist für den unterschiedlichen zeitlichen Verlauf der stoffwechselhemmenden Wirkung der einzelnen Metalle. Sowohl in der Membran selbst als auch im Zytoplasma stehen den eindringenden Ionen organische Liganden für eine Komplexbildung zur Verfügung.

Neben der experimentellen Analyse kann die Ligandenfeldtheorie Aufschluß darüber geben, welche Reaktionen energetisch möglich bzw. günstig sind. Durch Vergleich der Stabilitätskonstanten der einzelnen metallorganischen Komplexe kann die Frage nach den tatsächlich erfolgenden Bindungen beantwortet werden.

4.1 Protein-Affinität der Metalle*

Von besonderer Bedeutung für die Erklärung der oligodynamischen Wirkungsmechanismen ist die Protein-Affinität der Metalle sowie die Art der chemischen Bindung der entstehender Metallkomplexe. Bei der Untersuchung der Bindungsart stellt sich die Frage, ob Atom- oder Ionenbindung vorherrscht. Metall-Atome bzw. -Ionen, vor allem diejenigen der Übergangs- oder d-Metalle, liegen in den Komplexen als Zentralatome vor; sie sind von anorganischen oder organischen aber metallfreien Liganden umgeben. Die Metall-Protein-Bindung wird am besten beschrieben mit Hilfe der Ligandenfeldtheorie, die sich im wesentlichen auf die Betrachtung der elektrostatischen Kräfte der die Komplexe bildenden Ionen beschränkt. Sie benützt sich jedoch nicht mit einem einfachen Ionenmodell der Komplexe mit kugelförmigen, sich gegenseitig nicht beeinflussenden Ionen bzw. Di-

*Einige Betrachtungen wurden aus Christen, 1969 entnommen.

polmolekülen als Komplexliganden. Sie untersucht vielmehr die Auswirkungen des durch die Liganden verursachten elektrischen Feldes auf die d-Atomorbitale des Zentralions.

Die Bindungsenergie des Komplexes ergibt sich aus der Summe der Energie der Anziehung zwischen Zentralion und Liganden und der Energie der Abstoßung zwischen Liganden und Valenzelketronen des Kations. Die physikalischen und chemischen Eigenschaften eines Komplexes Metallion-Ligand hängen stark von den Veränderungen ab, welche die Elektronen - insbesondere die Elektronen der bei den Übergangsmetallen unvollständig besetzten d-Niveaus - als Folge des Ligandenfeldes erfahren (Bergmann et al, 1981).

Eine besondere Bedeutung bei der Bildung von Metallkomplexen haben die d-Atomorbitale.

Für das Wasserstoffatom lassen sich mit Hilfe der Schrödinger-Gleichung berechnen. Sie weisen fünffache Entartung auf.

Unterliegen die Orbitale der Wirkung eines elektrischen Feldes, wie es vom Liganden erzeugt wird, so wird die Entartung der d-Orbitale aufgehoben, sofern es sich nicht um ein kugelsymmetrisches Ligandenfeld handelt. Die d-Elektronen des Zentralions und die Elektronen der Liganden stoßen sich gegenseitig ab, sodaß die Energie derjenigen Orbitale, die in der Richtung der Liganden ihre größte Ladungsdichte besitzen, erhöht wird.

Die von den Liganden weiter entfernten Orbitale werden energieärmer, d.h. die fünf d-Atomorbitale lassen sich in Gruppen verschiedener Energie einteilen (Abb. 4.1).

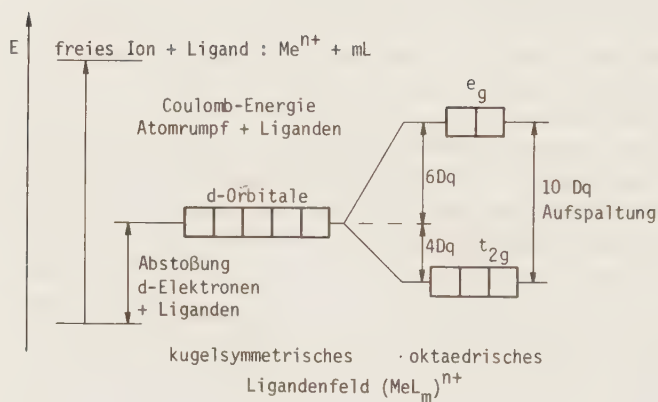


Abb. 4.1 Aufspaltung der d-Orbitale im oktaedrischen Ligandenfeld. Modifiziert nach Cordes

Die Energiedifferenzen zwischen einem Komplex, in welchem die Elektronen durch Aufspaltung z.B. auf die Triplet t_{2g} und Dublett e_g Niveaus verteilt sind, und einem hypothetischen System, in welchem die gleiche Anzahl Elektronen die fünffach entarteten Niveaus besetzen, wird als Kristallfeldstabilisierungsenergie (CFS-Energie) bezeichnet.

Maßgeblich für die Möglichkeit der Komplexbildung zwischen einem organischen Liganden und einem Metallion, sowie für die Stabilität des entstehenden Komplexes ist die mit der Komplexbildung verknüpfte Änderung der freien Enthalpie:

$$(4.2) \quad \Delta G^{\circ} = \Delta H^{\circ} - T \Delta S^{\circ}$$

Diese hängt ab von der Änderung sowohl der Enthalpie, als auch der Entropie. Eine Komplexbildung ist nur möglich, wenn die freie Enthalpie hierbei abnimmt. Die Stabilität des Komplexes wird durch seine Stabilitätskonstante K an-

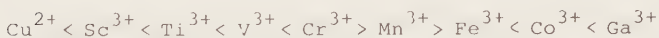
gegeben:

$$(4.3) \quad K = e^{-\frac{\Delta G^0}{RT}}$$

Die Stabilitätskonstante ist ein Maß für die Differenz zwischen der freien Enthalpie des Komplexes und der freien Enthalpie von Metallion und Ligand. Diese Differenz wird umso größer, d.h. der Komplex umso stabiler, je größer die mit der Komplexbildung einhergehende Enthalpieabnahme bzw. Entropiezunahme ist (Reich, 1978).

Durch die Bestimmung der Stabilitätskonstanten der Metall-Protein-Komplexe der verschiedenen Metalle besteht die Möglichkeit, hinsichtlich der vorliegenden Problemstellung zu entscheiden, ob die Bildung eines entsprechenden metallorganischen Komplexes und damit eine Proteindenaturierung möglich, bzw. wie groß die Proteinaffinität und damit die oligodynamische Wirkungsstärke des Metalls ist.

Betrachtet man beispielsweise die Hydratationsenthalpien der +2 und +3fach geladenen Ionen der Übergangsmetalle, so ergibt sich folgende natürliche Reihe für die Komplexstabilität:



Die Zahlenwerte für die Hydratationsenthalpie gehen aus Abb. 4.2 hervor. Da die Werte für die Änderung der Entropie bei der Hydratation klein sind gegenüber der Änderung der Enthalpie, wird der Verlauf der Kurve für die freie Hydratationsenthalpie bestimmt von der Enthalpie.

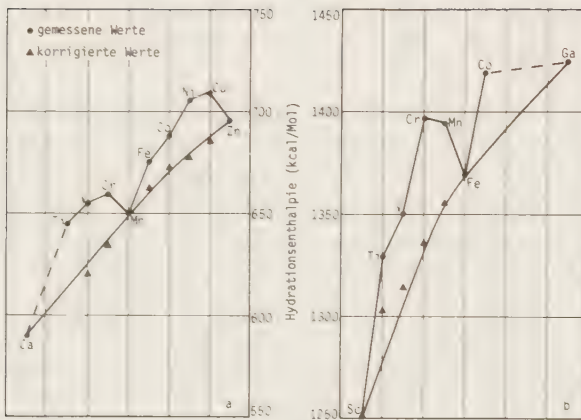


Abb. 4.2 Hydratationsenthalpie von +2fach (a) und +3fach (b) geladenen Ionen der Übergangsmetalle. Modifiziert nach Christen

Wäre die Ladungsdichteverteilung aller Ionen völlig kugelsymmetrisch, so würde dies eine von Ca^{2+} zum Zn^{2+} stetig ansteigende Kurve bedeuten, entsprechend dem mit wachsender Ordnungszahl abnehmenden Ionenradius. Die Werte für die Ionen mit Elektronenkonfiguration d^0 , d^5 und d^{10} (Zn^{2+} , siehe Tab. 4.1), bei denen keine Kristallfeldstabilisierung möglich

Tab. 4.1

Elektronenkonfiguration der Übergangsmetalle

Ordnungszahl	Element	Schale						2-fach positiv geladene Ionen		
		K	L	M			N	3d (M-Schale)		
		1s	2s	2p	3s	3p	3d	4s	4p	
22	Titan	2	2	6	2	6	2	2		2
24	Chrom	2	2	6	2	6	5	1		4
26	Eisen	2	2	6	2	6	6	2		6
27	Kobalt	2	2	6	2	6	7	2		7
28	Nickel	2	2	6	2	6	8	2		8
29	Kupfer	2	2	6	2	6	10	1		9
30	Zink	2	2	6	2	6	10	2		10

ist (Ladungsdichte insgesamt kugelsymmetrisch), liegen tatsächlich auf solch einer Kurve. Subtrahiert man von den experimentell ermittelten Hydratationsenthalpien der übrigen Aquokomplexe die CFS-Energie, so liegen diese Werte ziemlich genau auf der Kurve, die durch die d^0 , d^5 und d^{10} Ionen gegeben ist (Tab. 4.1).

Da nach Gl. 4.2/4.3 für die Komplexstabilität auch die mit seiner Bildung verbundene Entropie eine wichtige Rolle spielt, stellt sich die Frage, welche Verhältnisse diesbezüglich bei der Reaktion zwischen Metallionen und Proteinen vorliegen. Bei der Auflösung von Metallen in wässrigen Lösungen, wie sie die Substrate für Baktereinkulturen darstellen, bilden sich stets Aquokomplexe für Metallionen. Bildet sich durch Ligandensubstitution aus dem Aquokomplex eines Metallions ein Metall-Protein-Komplex, so nimmt die Entropie stark zu, da die Hydrathüllen sowohl des Proteins als auch des Metallions zerstört werden, d.h. H_2O -Moleküle werden durch negativ geladene Liganden ersetzt. Der neu entstehende Komplex weist eine geringere positive Ladung auf. Beispielsweise kann folgende Reaktion ablaufen:



Der neue Komplex bewirkt eine geringere Ordnung der Lösung und damit eine Erhöhung der Entropie. Diese Entropiezunahme begünstigt die Bildung des Metall-Protein-Komplexes.

Die Größe der Aufspaltung der Energieniveaus der d-Elektronen der Zentralionen bei der Komplexbildung beeinflusst eine Reihe von Eigenschaften der Komplexe, wie z.B. ihre Lichtabsorption und Stabilität. Von besonderem Interesse ist die Abhängigkeit der Aufspaltung von der Art der vorhandenen Liganden. Liganden mit großer negativer Ladung oder mit kleinen Radien, die sich aufgrund dessen dem Zentralion stark nähern können, werden zweifellos eine besonders große Aufspaltung bewirken. Auch Liganden mit

einem einzelnen freien Elektronenpaar, wie z.B. das NH_3 -Molekül, die die negative Ladung direkt auf das Zentralion hin richten, haben starke Aufspaltungen zur Folge. Geordnet nach der Stärke der Energieaufspaltung bei der Komplexbildung mit Übergangsmetallen läßt sich für die in der vorliegenden Arbeit bedeutsamen, im untersuchten organischen Milieu vorhandenen Liganden eine spektrochemische Reihe angeben:



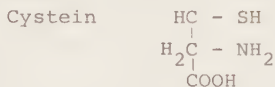
Eine Unregelmäßigkeit scheint bei $\text{OH}^- < \text{H}_2\text{O}$ aufzutreten, nämlich daß OH^- eine schwächere Aufspaltung als das H_2O -Molekül verursacht, obwohl es eine negative Ladung trägt. Dies rührt einerseits von dem starken Dipolcharakter von H_2O her, andererseits davon, daß das OH^- -Ion mit seinen drei nichtbindenden Elektronenpaaren eine größere Tendenz zur Übertragung negativer Ladung auf das Metallion zeigt, als das H_2O -Molekül. Dadurch wird die effektive Ladung des Metallions verringert und das Ausmaß der Aufspaltung verkleinert. Bei Neutralmolekülen als Liganden hängt die Neigung zur Komplexbildung neben ihrer Größe vor allem von ihrem Dipolmoment und ihrer Polarisierbarkeit ab. Der Einfluß der Ligandengröße auf die Komplexstabilität zeigt sich darin, daß das kleine F^- -Ion im Gegensatz zu den größeren Halogenid-Ionen stabilere Komplexe bildet.

Die Tendenz eines Liganden zur Komplexbildung wird umso größer, je stärker seine Nucleophilie ist. Stärker basische Liganden ergeben meist auch eine stärkere Aufspaltung der d-Niveaus des Zentralions und bilden stabilere Komplexe.

Stehen einem metallischen Zentralion mehrere organische Liganden zur Verfügung, so kann der spektrochemischen Reihe entnommen werden, welche Affinität die einzelnen Liganden zum Zentralion aufweisen. Daraus kann auf die Struktur der entstehenden metallorganischen Komplexe geschlossen

werden.

Am Beispiel von Cystein läßt sich einfach erkennen, welche Metall-Protein-Komplexe möglich sind:



Während die Kohlenstoffatome und die direkt an ein C-Atom gebundenen Wasserstoffatome weitgehend abgesättigt sind, also nur sehr geringe freie Valenzen aufweisen, bieten sich die Sulfhydryl- (SH), Amino- (NH₂) und Carboxylgruppen (COOH) als Bindungspartner für ein Metallion an. Da die Aminogruppe des Cystein stark nucleophilen Charakter aufweist, tritt eine Polarisierung des Cystein-Moleküls ein, bei der entweder die Sulfhydryl- oder die Carboxyl-Gruppe reduziert wird und das Wasserstoffatom an die Aminogruppe abgibt. Als mögliche Liganden stehen demnach den Metallionen je nach Polarisierungs- oder Reduktionsstufe folgende Gruppen zur Verfügung:



Auf die genaue Angabe der freien Valenzen der einzelnen Gruppen sei hier verzichtet, da sie noch vom Bindungszustand an das jeweilige C-Atom abhängen. So liegt die freie Valenz des Schwefelatoms im Cystein nach Abspaltung des H-Atoms bei etwa 2, demnach ist in der Reihe der Liganden neben S⁻ auch S²⁻ angeführt. Die stärkste Aufspaltung der Energieniveaus des Zentralatoms und damit die größte Komplexstabilität wird von der Sulfhydrylgruppe verursacht und zwar bei direkter Bindung Schwefel-Metall. Dieser Tatsache entspricht die charakteristische Affinität der Metalle zu den SH-Gruppen der Proteine.

Viele der für die Zelle lebenswichtigen Enzyme besitzen derartige Sulfhydrylgruppen. Sie können nur dann ihre Funktion erfüllen, wenn die SH-Gruppe frei und im reduzierten Zustand bleiben. Demnach sind solche Stoffe, die SH-Gruppen oxidieren oder sich mit ihnen stabil verbinden, wie die Metalle, starke Inhibitoren. Die entstehenden Komplexe werden als Merkapptide bzw. Thiogruppen bezeichnet.

Mögliche Reaktionen zwischen freien Sulfhydrylgruppen und Metallen sind in Abb. 4.3 dargestellt.

a) Einwertiges Metall



b) Zweiwertiges Metall



c) Dreiwertiges Metall



Abb. 4.3 Reaktionsmechanismen, die zur Bildung eines Metall-Protein-Komplexes über die Sulfhydrylgruppe führen.

4.2 Komplexstabilität Protein-Metall

Ausschlaggebend für die schädigende Wirkung der metallorganischen Komplexe ist deren Stabilität. Diese hängt einerseits ab von der Bindungsenergie zwischen Zentralion und Ligand, andererseits davon, ob neben der Bildung von Thiogruppen noch andere energetisch günstigere, aber unschädliche Reaktionen möglich sind. Dies stellt auch ein wesentliches Kriterium dafür dar, ob eine Zellschädigung reversibel oder irreversibel ist. So kann die Bildung eines stabilen Metallkomplexes dadurch verhindert werden, daß dem Metallion im Substrat ein stärkerer Ligand als die in der Zelle anzutreffenden Proteine angeboten wird. Da die Komplexbildung mit Ausnahme der einwertigen Metalle in mehreren Stufen ablaufen kann, lassen sich dementsprechend mehrere unterschiedliche Stabilitätskonstanten angeben. Die Konstanten K_n für die einzelnen Teilreaktionen sind definiert als:

$$(4.4) \quad K_n = \frac{[M L_n]}{[M L_{n-1}][L]} ; \quad ML_{n-1} + L \rightleftharpoons ML_n$$

Zur Zusammenfassung einzelner Teilschritte der Komplexbildung muß das Produkt der Einzelkonstanten berechnet werden. Die Gleichgewichtskonstante der ersten n Schritte der Komplexbildung ist definiert als:

$$(4.5) \quad \beta_n = \frac{[M L_n]}{[M][L]^n} = \prod_{i=1}^n K_i ; \quad M + nL \rightleftharpoons ML_n$$

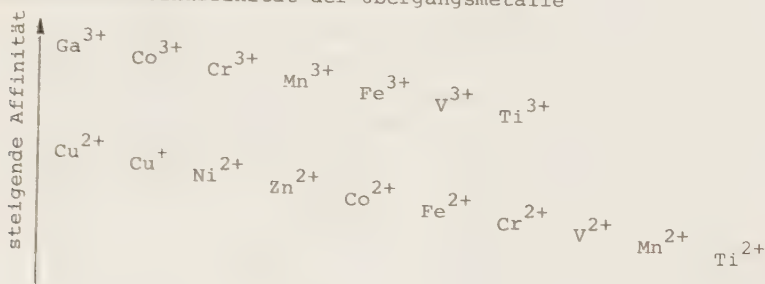
Die Gleichgewichtskonstante der Gesamtreaktion wird mit K bezeichnet.

Aus dem Vergleich der Konstanten für die Teilschritte der Komplexbildung läßt sich entnehmen, daß die Reaktionen vollständig ablaufen, d.h. daß die Metallionen ebensoviele Proteine bzw. Proteingruppen binden, wie es ihrer Ladungszahl entspricht. Reaktionen bei denen mehrfache Bindungen zwischen Ligand und Metallion auftreten, werden nicht beobachtet.

Je größer die Ladung des Metallions, umso größer ist auch seine Affinität zum Protein bzw. die Stabilität der entstehenden metallorganischen Komplexe. Dies gilt für ein einzelnes Metall ebenso wie für den Vergleich der Metalle untereinander. So sind die Stabilitätskonstanten für alle 3fach geladenen Ionen größer als diejenige der 2fach geladenen. Eine Ausnahme bildet lediglich das einwertige Kupferion, dessen Stabilitätskonstante knapp oberhalb derjenigen des 2-wertigen Nickels liegt (Tab. 4.2).

Tab. 4.2

Reihe der Proteinaffinität der Übergangsmetalle



Durch Vergleich der Komplexstabilität der in Abb. 4.6 beispielhaft aufgeführten Protein-Metall-Komplexe mit der Hydratationsenthalpie der einzelnen Metalle (Abb. 4.2) geht hervor, daß die Reihenfolge der Affinität der einzelnen Metalle zu den Proteinen die gleiche ist, wie diejenige der aus der Hydratationsenthalpie abgeleiteten Reihe.

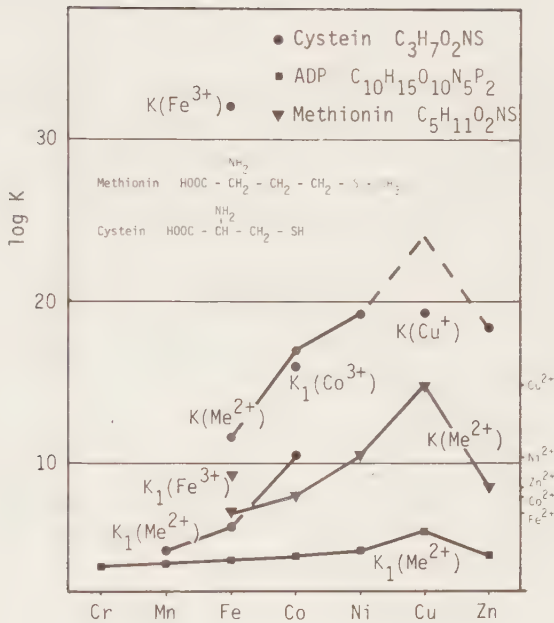


Abb. 4.4 Reihe der Proteinaffinität der Übergangsmetalle Modifiziert nach Sillen

Darüber hinaus zeigt sich deutlich, daß die Komplexe des Cystein stabiler sind als alle anderen Aminosäurekomplexe. Da Cystein als einzige der genannten Aminosäuren eine Sulfhydrylgruppe aufweist, liegt die Vermutung nahe, daß bei der Wechselwirkung mit Metallen - der spektrochemischen Reihe entsprechend - die besonders stabilen Thio- gruppen oder Merkaptide entstehen. Diesen kommt offensichtlich eine entscheidende Bedeutung bei der stoff- wechselhemmenden Wirkung der Metalle zu. Neben den charakteristischen Eigenschaften der einzelnen Metalle ist hinsichtlich ihrer tatsächlichen schädigenden

Wirkung natürlich nach dem Massenwirkungsgesetz die Konzentration der gelösten Ionen ausschlaggebend.

Eine bisher nie benutzte Möglichkeit zur Bestimmung der Konzentrationsabhängigkeit des CysteinKomplexes 1- und 2-wertiger Metalle wurde hier entwickelt. Daraus wurde die Konzentration der freien Liganden in Abhängigkeit von der Metallionenkonzentration bestimmt.

Löst man Gl. 4.4 für 1-wertige Ionen auf, so erhält man für das Verhältnis der Konzentration von metallorganischen Komplexen, also blockierten Proteinen zur Konzentration der verbleibenden Liganden:

$$(4.6) \quad \frac{[ML]}{[L]} = [Me^+] \cdot K$$

Der Verlauf des Quotienten $[ML]/[L]$ in Abhängigkeit von der Konzentration der Metallionen ist in Abb. 4.5 für Kupfer und Cystein dargestellt.

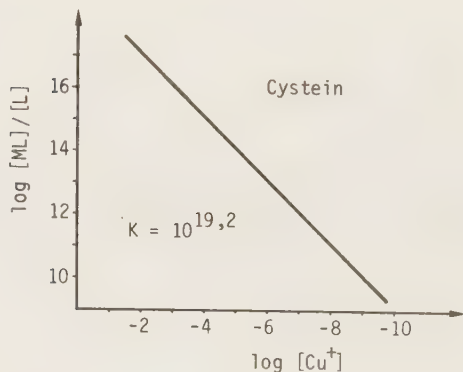


Abb. 4.5 Konzentrationsabhängigkeit der Bildung metallorganischer Komplexe bestimmt nach Gl. 4.6

Entsprechend gilt für 2-wertige Ionen (Abb. 4.6)

$$(4.7) \quad \frac{[ML_2]}{[L]^2} = K \cdot [Me^{2+}]$$

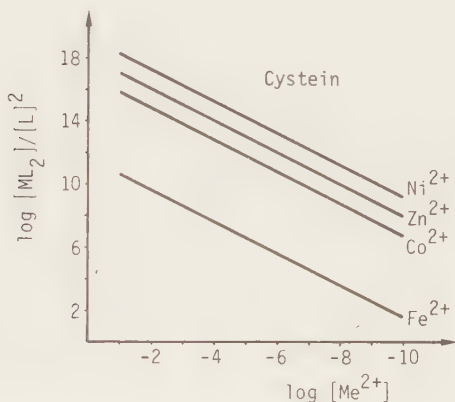


Abb. 4.6 Konzentrationsabhängigkeit des Cysteinkomplexes 2-wertiger Metalle bestimmt nach Gl. 4.7.

Um dieses Ergebnis mit dem Verlauf des experimentell bestimmten Hemmungsmaßes nach Abb. 5.5 besser vergleichen zu können, werden Gl. 4.6 und Gl. 4.7 aufgelöst nach der Konzentration der nicht blockierten Liganden, bei fester Gesamtkonzentration von Liganden C.

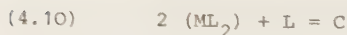
$$(4.8) \quad (ML) + (L) = C$$

und

$$(4.9) \quad (L) = \frac{C}{(Me^{+}) K + 1}$$

Die Konzentration der freien Liganden ist der Metallionen-Konzentration umgekehrt proportional.

Entsprechend gilt für zweiwertige Ionen:



und

$$(4.11) \quad \frac{1}{L} = \sqrt{\frac{2 K (Me^{2+})}{C} + \frac{1}{4C^2}} + \frac{1}{2C}$$

Für den in Abb. 4.7 dargestellten Bereich der Metallionenkonzentration und die Stabilitätskonstanten der Metall-Cystein-Komplexe gilt für Gl. 4.11 näherungsweise:

$$(4.12) \quad L \approx \sqrt{\frac{C}{2K \cdot (Me^{2+})}}$$

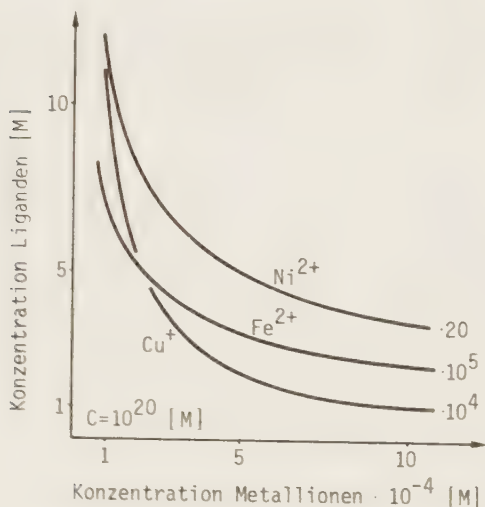


Abb. 4.7 Konzentration der freien Liganden in Abhängigkeit von der Metallionenkonzentration nach Gl. 4.12.

Der Verlauf der Konzentrationskurve der freien Liganden ent-

spricht demjenigen des experimentell bestimmten Hemmungsmaßes ϵ in Abhängigkeit von der Metallionenkonzentration.

Insgesamt zeigen die Ergebnisse die aus der Beschreibung der Wechselwirkung zwischen Proteinen und Metallionen mit Hilfe der Ligandenfeldtheorie und der Untersuchung der Komplexstabilitäten resultieren, eine vollständige Übereinstimmung mit den Messungen an Bakterien- und Zellkulturen. Neben der Angabe der oligodynamischen Wirkungsstärke der einzelnen Metalle, bzw. der Reihenfolge ihrer Proteinaffinitäten, läßt sich die Konzentrationsabhängigkeit der Hemmung, die von der Wertigkeit der Metallionen abhängt, angeben. Als letzter Nachweis der Richtigkeit der im vorangehenden entwickelten Beschreibung der Reaktionen, die zur Hemmung des Stoffwechsels führen, dient die experimentelle Strukturanalyse der entstehenden Metall-Protein-Komplexe.

5. Meßergebnisse

Im vorangehenden Kapitel wurde durch theoretische Betrachtungen eine Reihenfolge für die oligodynamischen Wirksamkeiten der einzelnen Metalle ermittelt. Es stellt sich die Frage, inwieweit die Reihenfolge der Hemmungsstärke metallischer Festkörper von den unterschiedlichen Löslichkeitsprodukten beeinflusst wird. Um die Abstufung der Wirksamkeiten festzustellen, mußte ein Hemmungsmaß definiert werden.

5.1 Auswertung der Wachstumskurven und Definition eines Hemmungsmaßes

Zur qualitativen Beurteilung der oligodynamischen Wirkung verschiedener Metalle kann die Methode der Lebendkeimzahlbestimmung herangezogen werden. Der Verlauf der Bakterienzahlkurve wird als Maß für die antimikrobielle Wirkung des Materials betrachtet. In Abb 5.1 ist das Ergebnis einer solchen Mes-

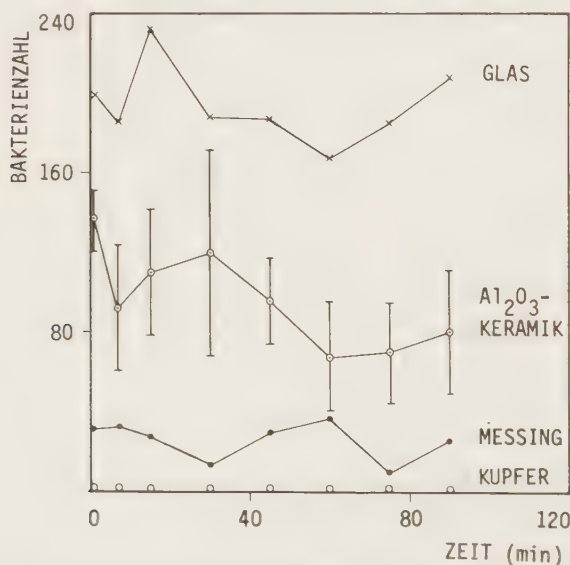


Abb. 5.1 Bestimmung des Wachstums von *Staphylococcus aureus* auf Glas, Aluminiumoxyd-Keramik, Messing und Kupfer mittels Koloniezählbestimmung auf TSA (Abklatsch).

sung darstellt. Die Nährsuspension bestand aus einem Gemisch physiologischer Kochsalzlösung und Tryptic-Soy-Bouillon mit *Staphylococcus aureus* in einer Konzentration von 10^5 Bakterien/ml. Davon wurden je $20\ \mu\text{l}$ auf einer Kupfer-, Messing-, Keramik- und Glasprobe ausgestrichen und in Abständen von etwa 15 Minuten mit Tryptic-Soy-Agar-Platten (TSA) abgeklatscht. Die Platten wurden 24 Stunden lang bei 37°C bebrütet und dann darauf die Kolonien ausgezählt. Das Ergebnis weist erhebliche Fehlerquoten auf. Für Keramik ist die Bandbreite der Abweichung dargestellt. Wegen der erheblichen Unsicherheit scheidet dieses Verfahren für die quantitative Analyse aus.

Wesentlich zuverlässigere Ergebnisse werden mit Hilfe der photometrischen Wachstumsmessung erzielt. Dieses Verfahren wurde bisher nur selten benutzt, da es primär nur Aufschluß über die Gesamtzahl (Abb. 5.2), d.h. die Summe der leben-

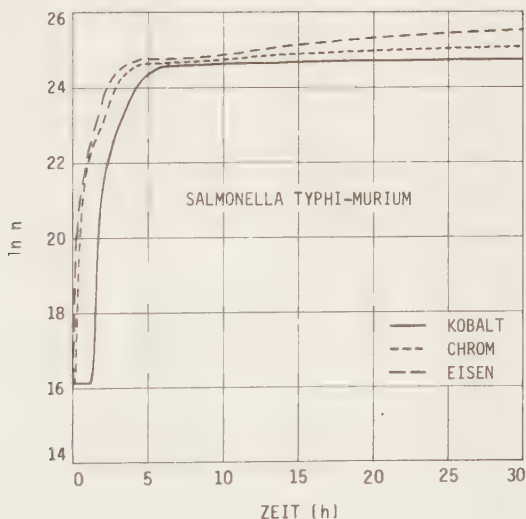


Abb. 5.2 Sigmoidförmige, photometrisch bestimmte kontinuierliche Wachstumskurven von *Salmonella typhi-murium* unter Metalleinfluß. Aufgetragen ist der natürliche Logarithmus der Bakterienzahl n der Kultur gegen die Zeit. Die maximale Streuung bei 8 Messungen betrug 5%.

den und der toten Bakterien gibt. Mit Hilfe des in Kap. 2.1.2 beschriebenen kinetischen Wachstumsmodells läßt sich eine Separation nach Wachstums- und Absterberate durchführen. Der Einfluß von Metallen auf die mikrobielle Wachstumskinetik äußert sich in einer Verschiebung der Relation zwischen Wachstums- und Absterbegeschwindigkeit in Richtung einer Vergrößerung der Absterbequote. Die hemmende Wirkung einzelner Metalle konnte bisher zwar qualitativ nachgewiesen werden, ein quantitatives Maß, das einen Vergleich zwischen unterschiedlichen Materialien zuläßt, existiert jedoch bisher nicht.

Zur qualitativen Beurteilung der oligodynamischen Wirkung war es üblich, die Bakterienzahlen von Kulturen nach einer bestimmten Wachstumszeit mit und ohne Einwirkung des zu beurteilenden Metalls zu messen. Wie kritisch die Ergebnisse derartiger Messungen jedoch zu betrachten sind, wenn die hemmende Wirkung nicht ausreicht, die gesamte Population abzutöten, geht aus dem in Abb. 5.3 dargestellten Beispiel

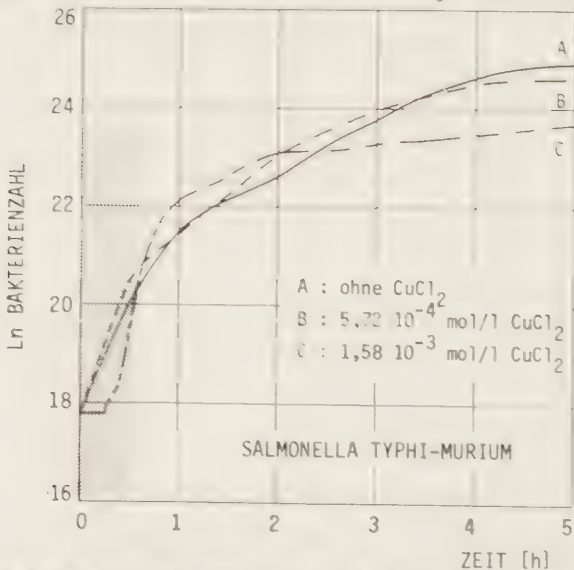


Abb. 5.3 Wachstumskurven dreier Kulturen von *Salmonella typhi-murium* während der ersten fünf Stunden des Wachstums. Die dargestellten Kurven wurden aus 10 Messungen gemittelt.

hervor. Aufgrund nicht beherrschbarer unterschiedlicher Anfangsbedingungen weisen die Populationen B und C unter Einfluß des Metalls anfangs ein stärkeres Wachstum auf, als diejenige ohne Metall (A). Die bisher übliche Auswertung des Wachstums aus dieser Kurve ohne Berücksichtigung der Sterbequote würde fälschlicherweise ergeben, daß Kupfer wachstumsbegünstigend wirkt. Erst die Berechnung der Wachstums- und Sterberaten (Tab. 5.1) nach dem in Kap. 2.1.2 beschriebenen kinetischen Modell zeigt die tatsächlichen Verhältnisse, d.h. den abtötenden Einfluß von Kupfer, auf.

Tab. 5.1

Wachstums- und Sterberaten von *Salmonella typhi-murium*, *Escherichia coli* und *Staphylococcus aureus* während der exponentiellen Phase unter dem Einfluß von Kupferionen.

Salmonella typhi-murium

CuCl_2	w	w-s	ε	Generationszeit
ohne	0,525	$5,388 \cdot 10^{-2}$	114,28	12,86 min
$5,27 \cdot 10^{-4}$ mol/l	1,052	$1,371 \cdot 10^{-2}$	13,2	50,56 min
$1,58 \cdot 10^{-3}$ mol/l	4,611	$1,184 \cdot 10^{-2}$	2,58	58,53 min

Staphylococcus aureus

CuCl_2	w	w-s	ε
ohne	5,273	$1,946 \cdot 10^{-2}$	3,7
$5,27 \cdot 10^{-4}$ mol/l	0,656	$1,417 \cdot 10^{-4}$	0,22

Escherichia coli

CuCl_2	w	w-s	ε
ohne	1,316	$2,657 \cdot 10^{-2}$	20,6
$1,58 \cdot 10^{-3}$ mol/l	1,971	$3,700 \cdot 10^{-3}$	1,88

Die Wachstumsrate nimmt entgegen den Erwartungen trotz Zugabe von Kupfer zu. Da jedoch gleichzeitig die Sterberate anwächst, und zwar stärker als die Wachstumsrate, verringert sich die Differenz (w-s), das Wachstum ist demnach gehemmt. Dies kommt auch in der nach Gl. 2.5 berechneten Generationszeit, d.h. der Zeit, in der sich die Anzahl der lebenden Bak-

terien verdoppelt, klar zum Ausdruck.

Da offenbar das Verhältnis der Wachstums- zur Sterbequote charakteristisch ist für den hemmenden Einfluß eines Stoffes, wird das Maß ϵ für die oligodynamische Wirkung definiert als:

(5.1)

$$\epsilon = \left(\frac{w}{s} - 1 \right) \times 1000$$

Die in Tab. 5.1 angegebenen Werte für ϵ zeigen deutlich die Wirkung der unterschiedlichen Kupferionenkonzentrationen.

In der Herleitung der Bestimmungsgleichungen für die Wachstums- und Sterbegeschwindigkeit wurde vorausgesetzt, daß w und s zumindest stückweise konstant sind, woraus sich in den jeweiligen Intervallen eine exponentielle Wachstumskurve ergibt.

Für die Phase des exponentiellen Wachstums (Abb. 2.1) ist diese Bedingung zwar recht genau erfüllt, während der übrigen Wachstumsphasen weisen w und s jedoch starke zeitliche Änderungen auf. Aus diesem Grund sind w und s als zeitabhängige Parameter zu betrachten; ihre Berechnung erfolgt derart, daß die Wachstumskurve zeitlich quantisiert und innerhalb der sich ergebenden Intervalle Konstanz der Parameter angenommen wird. Dieses Vorgehen entspricht einer stückweisen Approximation der Wachstumskurve durch Exponentialfunktionen.

In Abb. 5.4 ist oben die Bakterienzahlkurve von Salmonella typhi-murium unter dem Einfluß von Chrom (Zugabe von $4,61 \times 10^{-4}$ mol/l CrCl_3) aufgetragen, darunter die mittels kinetischem Wachstumsmodell errechneten Wachstumsparameter.

Die einzelnen Phasen des diauxischen Wachstumsverlaufs sind deutlich erkennbar.

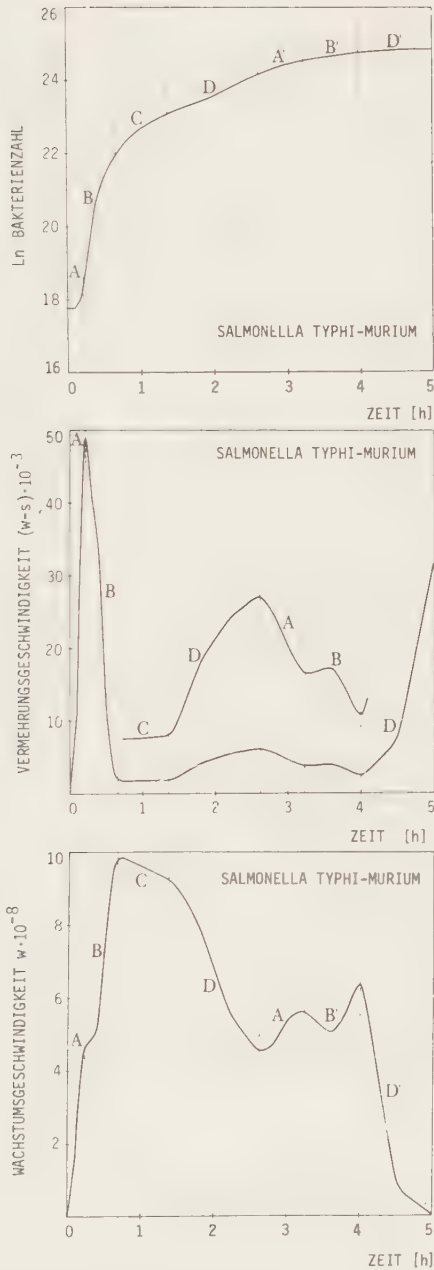


Abb. 5.4 Diauxischer Wachstumsverlauf von *Salmonella typhi-murium* unter dem Einfluß von Chromionen ($4,6 \cdot 10^{-4} \text{ mol/l CrCl}_3$). A=Latenzphase, B=Beschleunigungsphase, C= exponentielle Phase, D= Verzögerungsphase

Die genaue Analyse der Wachstumsparameter zeigt, daß die oligodynamische Wirkung eines Metalls keinen konstanten Wert aufweist, sondern abhängig ist von der bakteriellen Wachstumsphase. Dies ist zum einen zurückzuführen auf den Einfluß, den der sich verändernde pH-Wert der Nährlösung auf den Stoffwechsel und damit die Wechselwirkung der Bakterien mit den Metallionen ausübt, zum anderen ändert sich mit dem Anwachsen der Zellzahl auch die effektive Konzentration der Metallionen. Bei Zugabe des Metalls als vollständig dissoziiertes Salz ist dies offensichtlich, da sich zwar die Bakterienzahl, nicht aber die Zahl der zur Verfügung stehenden Metallionen erhöht. Völlig anders liegen die Verhältnisse bei Zugabe des Metalls als Festkörper. Abhängig vom pH-Wert ändert sich die Löslichkeit des Metalls (Kap. 3.3.3.2 und Kap. 5.5), dementsprechend auch das Verhältnis zwischen Bakterienzahl und Ionenkonzentration. Darüber hinaus kann man davon ausgehen, daß sich die Phasengrenze Metall-Nährmedium wegen der niedrigen Geschwindigkeit des bakteriellen Wachstums stets annähernd im Gleichgewicht befindet, daß also diejenigen Metallionen, die durch eine chemische Reaktion fest gebunden werden, ständig vom Metall nachgeliefert werden.

Beim Vergleich der hemmenden Wirkung unterschiedlicher Stoffe ist deshalb zu beachten, daß nicht nur gleiche Versuchsbedingungen (Festkörper oder gelöste Ionen) vorliegen, sondern daß auch jeweils gleiche Wachstumsphasen miteinander verglichen werden. Die Relationen zwischen der Wirksamkeit der Stoffe bleiben in den unterschiedlichen Phasen annähernd konstant. Da die Wachstumsparameter während der Phase des exponentiellen Wachstums über längere Zeit konstant sind, die Segmentierung der Wachstumskurve demnach am unkritischsten ist, empfiehlt sich dieser Bereich besonders für die Auswertung, wie dies bei der

Berechnung der Werte in den Tabellen 5.1 und 5.2 erfolgt ist.

Tab. 5.2

Hemmungsmaß zweier Bakterienarten unter dem Einfluß von Kupfer während der exponentiellen Phase

CuCl ₂	ε für E.coli	ε für Salmonella typhi-murium
ohne	20,6 ± 2,5 %	114,28 ± 5,0 %
1 x 10 ⁻⁴ mol/l	14,63 ± 3,1 %	73,14 ± 3,8 %
2 x 10 ⁻⁴ mol/l	10,51 ± 1,7 %	55,99 ± 4,2 %
3 x 10 ⁻⁴ mol/l	7,21 ± 2,0 %	26,28 ± 3,4 %
6 x 10 ⁻⁴ mol/l	3,71 ± 3,5 %	7,99 ± 4,5 %
1 x 10 ⁻³ mol/l	2,06 ± 1,2 %	3,99 ± 3,3 %

Zur Bestimmung der Konzentrationsabhängigkeit der oligodynamischen Wirkung von Kupfer wurde für unterschiedliche Kupferionenkonzentrationen und mehrerer Bakterienarten das Hemmungsmaß ε während der exponentiellen Wachstumsphase (Abb. 5.5) be-

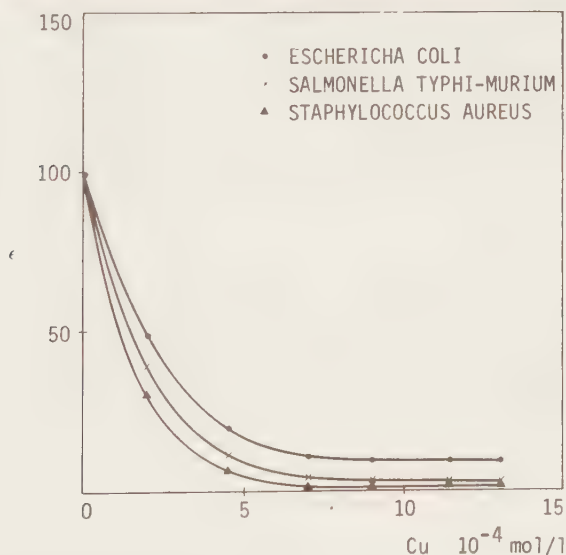


Abb. 5.5 Die oligodynamische Wirkung von Kupfer in Abhängigkeit von der Konzentration. Das Kupfer ist in Form von CuCl₂ dem Substratbeigemisch.

stimmt. Die resultierenden Werte wurden jeweils auf das Wachstum ohne Einfluß von Kupfer normiert. Es zeigt sich deutlich die zunehmende bakterizide Wirkung von Kupfer bei steigender Ionenkonzentration. Die Wirkung tritt bei allen untersuchten Bakterienarten auf, variiert jedoch in der Stärke, wobei deutliche Unterschiede zwischen grampositiven und gramnegativen Bakterien erkennbar sind.

Zum quantitativen Vergleich der hemmenden Wirkung unterschiedlicher Metalle wurde in einer Meßreihe für jeweils gleiche Ionenkonzentrationen (5×10^{-4} mol/l) das Hemmungsmaß für *Salmonella typhi-murium* bestimmt. In Tab. 5.3 sind neben dem Hemmungsmaß selbst auch die Wertigkeit der Metallionen aufgeführt.

Tab. 5.3

Hemmungsmaße verschiedener Metalle für *Salmonella typhi-murium* in der exponentiellen Phase bei jeweils gleicher Metallionenkonzentration. Substrat: 15 ml TSB und 12 ml physiologische Kochsalzlösung

Metall	ε	Wertigkeit	Zugabe als:
ohne	114,28		
Titan	24,7	3	TiCl ₃
Kobalt	21,6	2	CoCl ₂
Nickel	13,0	2	NiCl ₂
Kupfer	12,3	2	CuCl ₂
Eisen	0,02	3	FeCl ₃

Bei den angegebenen 2-wertigen Metallen stimmt die Reihenfolge mit der in Kap. 4.1 angegebenen Reihe überein. Eine wesentlich größere antimikrobielle Wirkung weist das 3-wertige Eisen auf, was ebenfalls in Einklang mit den theoretischen Ergebnissen steht.

Aus den Ergebnissen der Wachstumsmessungen läßt sich folgende Systematik für den Grad der Hemmung ableiten:

1. Je weniger Elektronen das neutrale Atom in der M-Schale besitzt, umso schwächer ist die abtötende Wirkung des Metalls.
2. Je größer der Ionisationsgrad ist, umso stärker zeigt sich die hemmende Wirkung der Metallionen.

Hinsichtlich der Konzentrationsabhängigkeit des Grads der Hemmung weisen alle untersuchten Metalle das gleiche Verhalten auf wie Kupfer (Abb. 5.5), d.h. es ist ein starker Anstieg der Hemmung mit der Konzentration zu beobachten. Vergleicht man die oligodynamische Wirkstärke verschiedener metallischer Festkörper, so zeigt sich, daß die Werte im wesentlichen das gleiche Verhältnis aufweisen wie ihre Löslichkeiten. Diese ist dabei nicht nur abhängig vom Metall, sondern auch vom Zustand der Oberfläche. So weist z.B. ein Festkörper aus Titan, dessen Oberfläche an Luft spontan zu TiO_2 oxidiert, eine derart geringe Löslichkeit auf ($\approx 10^{-35}$ mol/l), daß eine hemmende Wirkung - wie sie sich bei Titanchlorid im sauren Bereich andeutet - nicht feststellbar ist. Dieses Ergebnis läßt vermuten, daß die Mechanismen der oligodynamischen Wirkung ausschließlich auf Wechselwirkung zwischen Zellen bzw. Proteinen und gelösten Metallionen zurückzuführen sind, die Oberfläche eines metallischen Festkörpers also nur hinsichtlich seiner Löslichkeit von Bedeutung ist (vgl. Kap. 5.3).

5.2 Wachstumskinetik und -dynamik von Fibroblasten

Da die meisten Messungen bei Gewebekulturen schwieriger durchzuführen waren als bei Bakterien, bot sich zur qualitativen Beurteilung der antizellulären Wirkung die Beobachtung der Morphologie der Fibroblasten an, da das Gewebe bei der Schädigung durch Metalle signifikante Strukturänderungen aufweist. Die Fibroblasten verlieren dabei ihre charakteristische Gestalt (Abb. 5.6) und ziehen sich kugelförmig zusammen (Abb. 5.7).



Abb. 5.6 Charakteristische Gestalt von Fibroblasten

Ein weiteres qualitatives Kriterium zur Feststellung der schädigenden Wirkung von Metallionen stellt der pH-Wert dar. Der pH-Wert, der in der exponentiellen Wachstumsphase nur eine geringe Änderung von seinem annähernd neutralen Ausgangswert zum Säuren hin aufweist ($\text{pH} \approx 6,5$), schlägt in Anwesenheit von Metallionen sehr schnell um ins Basische, was aus dem Farbumschlag des pH-Wert-Indikators hervorgeht, der dem Nährmedium MEM stets beigemischt ist.



Abb. 5.7 Fibroblastenkulturen im Kontakt mit einem Metall. In der Nähe des Metalls nimmt die Dichte der geschädigten, kugelförmigen Zellen zu.

Um ein quantitatives Hemmungsmaß angeben zu können, wurden die Fibroblasten 48 Stunden nach Zugabe von festen metallischen Proben ausgezählt. Im Vergleich mit dem Wachstumsverhalten der Zellen ohne metallischen Einfluß (Tab. 5.4) zeigte sich, daß die Wirkungsstärke der Hemmung die gleiche Abstufung in Abhängigkeit von der Metallart aufweist, wie bei Mikroorganismen.

Tab. 5.4

Beeinflussung der Zellzahldichte von Fibroblasten durch metallische Festkörper. Zum Vergleich ist das Hemmungsmaß der gleichen Metalle bezüglich Mikroorganismen angegeben.

Metall	Fibroblasten/mm ²	€
		(bei Salmonella typhimurium)
ohne	64	114,3
Titan	65	113,7
Protasul	34	111,8
Kupfer	29	110,2

Die Bestimmung der Konzentrationsabhängigkeit der oligodynamischen Wirkung wurde stellvertretend für die übrigen Metalle für Kupfer durchgeführt (Abb 5.8).

Eine Abweichung des Verlaufs der hemmenden Wirkung in Abhängigkeit von der Konzentration im Vergleich zu Bakterien konnte nicht festgestellt werden.

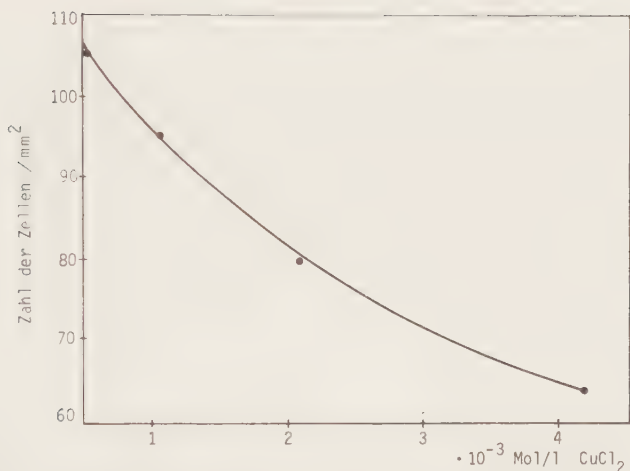


Abb. 5.8 Der Einfluß von Kupferionen auf das Wachstum von Fibroblasten. Die Streuung von 15 Messungen betrug 10%.

Zur genauen Analyse der Stoffwechselfunktion, die ein Maß für die Intaktheit der Zellen ist und damit für ihre Vermehrungsfähigkeit wurde die Messung des Membranpotentials an einzelnen Fibroblasten durchgeführt. Dies sollte Aufschluß darüber geben, ob der zelluläre Metabolismus nach Kontakt mit Metallionen noch aufrechterhalten oder reduziert ist, bzw. völlig zusammenbricht.

Das Ruhepotential einer intakten, stoffwechselaktiven Zelle wird durch den Einfluß eines toxisch wirkenden Metalls abgebaut. Hierfür sind im wesentlichen zwei Mechanismen verantwortlich. Einerseits wird durch die Hemmung des Stoffwechsels der aktive Ionentransport durch die Zellmembran reduziert bzw. unterbunden. Hierdurch stellen sich intrazellulär Ionenkonzentrationen ein, die auf rein passiven Diffusionsmechanismen basieren und durch ein geringeres Potential ($\approx 50 \text{ mV}$) gekennzeichnet sind. Andererseits kommt es durch das Eindringen von Metallionen in die Zellmembran bzw. in den intrazellulären Raum zu einer Neutralisation der negativ geladenen, fixierten Proteine. Dies wiederum bedeutet, daß das Donnan-Gleichgewicht zu-

nimmt, d.h. gegen Eins geht. Als Konsequenz verschwindet zum einen das Membranpotential, zum anderen führt dies zum Abbau des kolloidosmotischen Drucks, wodurch die Konsistenz der Fibroblasten aufgehoben wird. Dies ist aus der veränderten Morphologie der Zelle ersichtlich. Die Messung des Zellpotentials (Abb. 5.9) zeigt, daß der Stoffwechsel der Fibroblasten durch den Einfluß der Metallionen gehemmt wird bzw. völlig zusammenbricht.

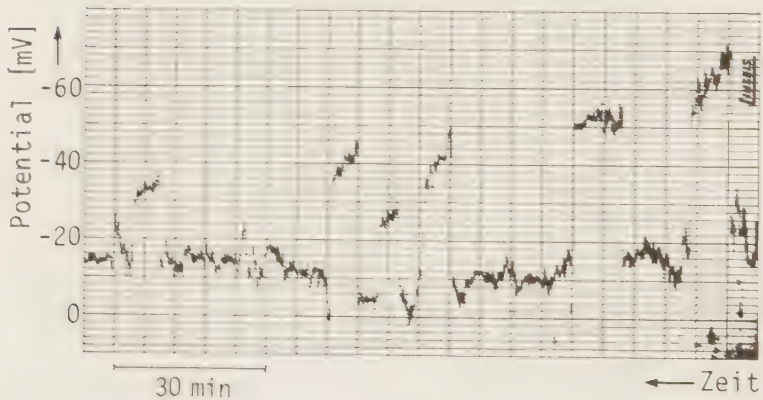


Abb. 5.9 Abnahme des Zellpotentials unter dem Einfluß von Metallionen.

Die genaue Erfassung des zeitlichen Verlaufs des Transmembranpotentials ist nur mit sehr großem experimentellen Aufwand möglich. Da die Zellmembran durch das Einstechen der Mikroelektrode eine Verletzung erfährt, baut sich ihr Potential innerhalb von etwa 30 Minuten ab. Verantwortlich ist hierfür offenbar, daß an der Einstichstelle ein relativ ungehinderter Ein- und Ausstrom von Ionen erfolgen kann. Demzufolge ist für die Bestimmung des Zellpotentials in

Abhängigkeit von einer möglichen Schädigung durch Metallionen nur das Potential zum Zeitpunkt des Einstichs der Elektrode auswertbar. Zur Verfolgung des zeitlichen Verlaufs der Stoffwechselhemmung muß deshalb nacheinander an verschiedenen Zellen das Potential gemessen werden. Hierbei besteht jedoch das Problem, daß die Schädigung der Zellen durch Metallionen nicht bei allen Zellen synchron einsetzt, sondern statistisch verteilt ist. Bei der Messung des Membranpotentials ist also nicht bekannt, in welchem Stadium der Schädigung sich die Zelle befindet. Um eine zuverlässige Aussage über den zeitlichen Verlauf des Potentials machen zu können, müssen demnach zu jedem Zeitpunkt die Potentiale vieler Zellen gleichzeitig bestimmt und statistisch ausgewertet werden. Hierauf wurde in der vorliegenden Arbeit jedoch verzichtet, da es zur Beantwortung der Frage, ob der Einfluß der Metallionen nur den Verlust der Fähigkeit zur Zellteilung verursacht, oder zum Absterben der Zellen führt, ausreichte, nachzuweisen, daß zumindest bei einem erheblichen Anteil der Zellen der Stoffwechsel blockiert wird (Abb. 5.9). Die Wechselwirkung zwischen Metallionen und Zellen führt demnach tatsächlich zum Absterben der Zellen.

Aus den an Fibroblasten durchgeführten Messungen geht hervor, daß die Ergebnisse hinsichtlich der oligodynamischen Wirkung bei Bakterienkulturen auf Fibroblasten übertragbar sind. Sowohl die Reihenfolge der abtötenden Wirkung der einzelnen Metalls als auch der Einfluß der Ionenkonzentrationen stimmen überein. Es zeigen sich lediglich Unterschiede hinsichtlich der Geschwindigkeit der zeitlichen Abläufe. Da die Stoffwechselfunktionen bei Fibroblasten langsamer ablaufen als bei Bakterien, zeigt sich auch die hemmende Wirkung der Metallionen später.

5.3 Experimentelle Überprüfung des Einflusses metallischer Oberflächen auf die Wachstumskinetik

In drei Experimenten wurde untersucht, ob die Wechselwirkung zwischen Mikroorganismen und metallischen Festkörpern für die antimikrobielle Wirkung der Metalle von Bedeutung ist. Folgende Experimente wurden durchgeführt (Kap. 3.3.2):

1. Zugabe eines metallischen Festkörpers zur Bakteriensuspension
2. Das Metall wurde von einem Bakterienfilter umgeben und in die mit Bakterien beimpfte Nährlösung gegeben.
3. Der Suspension wurden gelöste Metallionen zugegeben in einer Konzentration, die derjenigen entsprach, die sich bei Versuch 1 und 2 durch Auflösung des Metalls einstellte.

Die Auswertung der Wachstumskurven ergab eine gute Übereinstimmung der hemmenden Wirkungsstärke in allen drei Fällen (Tab. 5.5). Daraus läßt sich eindeutig folgern, daß die

Tab. 5.5

Hemmungsmaß ϵ für Kupfer und Staphylococcus aureus unter direktem und indirektem Einfluß von festem Kupfer sowie gelöster Cu-Ionen. Die Ionenkonzentration im Substrat beträgt in allen drei Fällen 10^{-9} mol/l. ϵ ist auf den Wert 1 für das Wachstum ohne Metall normiert.

Metall	Hemmungsmaß ϵ
Festkörper Kupfer	$0,967 \pm 0,01$
Festkörper Kupfer + Membran	$0,969 \pm 0,015$
gelöste Kupferionen (CuCl_2)	$0,959 \pm 0,012$

direkte Wechselwirkung zwischen Organismus und metallischem Festkörper für die oligodynamischen Mechanismen ohne Bedeutung ist. Alle physikalisch-chemischen Prozesse, die

zur Hemmung des mikrobiellen Stoffwechsels und dem Absterben der Zelle führen, sind mit den im Nährmedium gelösten Metall-Ionen verbunden. Deshalb findet die Phasengrenze zwischen metallischem Festkörper und Nährsubstrat in der vorliegenden Arbeit nur insofern Beachtung, als aus ihrem Potentialgradienten die Löslichkeit des Metalls bzw. die Konzentration der gelösten Metall-Ionen bestimmt werden kann.

5.4 Konzentrationsbestimmung mittels Potentialmessung

In Kap. 4 wurde teils durch experimentelle Untersuchungen teils durch theoretische Betrachtungen eine Reihenfolge für die oligodynamische Wirksamkeit der einzelnen Metalle ermittelt. Es zeigte sich, daß diese Reihe nur so lange Gültigkeit besitzt, wie die einzelnen Metalle in gleichen Konzentrationen als Ionen im biologischen Medium vorliegen. Angesichts der Tatsache, daß derartige Verhältnisse gleicher ionaler Konzentrationen bei der praktischen Anwendung von Metallen zur Keimtötung oder beim Einsatz als Implantate wegen der unterschiedlichen Löslichkeit der einzelnen Metalle nicht vorliegen, stellt sich die Frage, in wie weit die Reihenfolge der Hemmungsstärke der Metalle von den unterschiedlichen Lösungsprodukten beeinflußt werden.

Die Konzentrationsabhängigkeit der Redoxpotentiale bietet die Möglichkeit die Konzentration gelöster Ionen durch die Messung des Potentials der Metallelektrode kontinuierlich zu bestimmen.

Tab. 5.6 gibt einen Überblick über die Potentiale einiger Metalle, wie sie sich zu Beginn der Messungen in Bakterienkulturen einstellten.

Tab. 5.6

Elektrodenpotentiale verschiedener Metalle gemessen gegen Kalomel in TSB und NaCl bei dem pH-Wert $7,07 \pm 1\%$

Metall	Elektrodenpotential mV GKE
Kupfer	$- 268 \pm 2,4\%$
Titan	$- 522 \pm 3,3\%$
Stahl AISI 316L	$- 205 \pm 1,5\%$
MP 35N	$- 322 \pm 2,5\%$
Messing	$- 275 \pm 1,5\%$

Selbst Kupfer weist im verwendeten Nährsubstrat ein negatives Potential von $- 268$ mV GKE bzw. $- 26,5$ NHE auf. Bei der Bestimmung der Normalpotentiale der Elektroden ist der jeweilige Zustand der Oberfläche (z.B. Oxydschicht) zu berücksichtigen.

Während der einzelnen Stoffwechselphasen von Bakterienkulturen unterliegt das Potential der metallischen Elektroden im Substrat einer ständigen Änderung (Abb. 5.10). Da die Nährlösung einer Bakterienkultur während der Messung nicht erneuert wird, erfährt es durch organische Säuren, die beim Stoffwechsel der Zellen produziert werden, eine Ansäuerung.

Dies bedeutet eine Eigenlimitierung des bakteriellen Wachstums, da der Stoffwechsel durch die Ansäuerung des Mediums stark eingeschränkt wird.

Der Säuregehalt des Substrats nimmt aber nicht nur Einfluß auf das Wachstum, sondern auch auf die Löslichkeit der Metallelektrode, was sich in einer Änderung des Gleich-

gewichtspotentials (Abb. 5.10), das sich im Kontakt mit der Nährlösung befindet einstellt, ausdrückt.

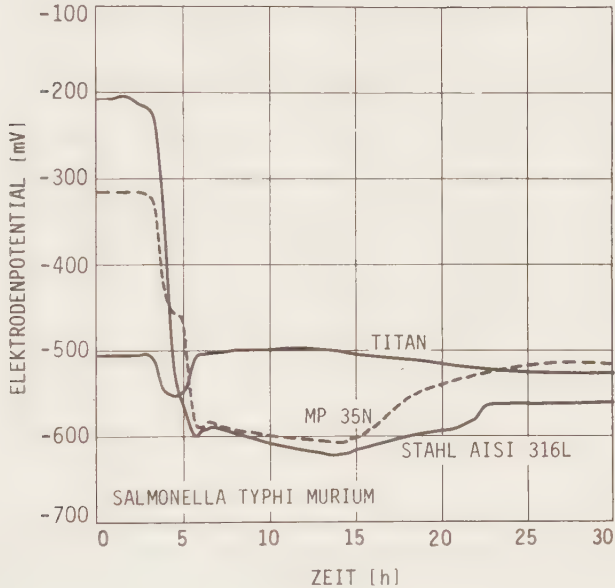


Abb. 5.10 Potentialverlauf unterschiedlicher Metalle während der bakteriellen Wachstumsphasen in TSB und NaCl. Zur Größe der Fehler vergleiche Tab. 5.6

Der Verlauf von Elektrodenpotential und Konzentration gelöster Ionen hängt sowohl von dem Metall selbst als auch von der Art der Bakterien, d.h. der Zusammensetzung der

verschiedenen Stoffwechselprodukte ab (Abb. 5.11).

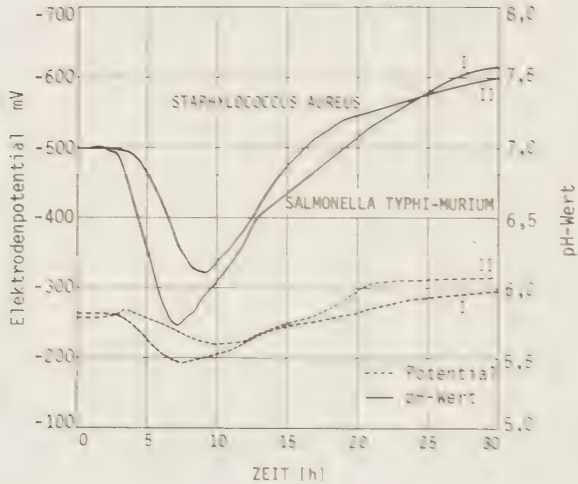


Abb. 5.11 Potentialänderung von Kupfer durch bakterielle Säure-Base-Produktion. Die durchgezogene Kurve gibt den Verlauf der pH-Wert Kurve von Staphylococcus aureus bzw. Salmonella typhi-murium wieder während der verschiedenen Wachstumsphasen, die gestrichelte Kurve den jeweils dazugehörigen Potentialverlauf von Cu.

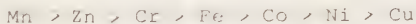
Die mit der Säureproduktion einhergehenden Potential- und Konzentrationsänderungen sind bei den einzelnen Metallen unterschiedlich stark ausgeprägt, weisen aber alle während der exponentiellen Wachstumsphase ein Maximum auf.

Die geringste Potentialverschiebung weist Titan auf, das wegen der Bildung einer passivierenden Deckschicht (Titanoxyd) nur in verschwindendem Maße in Lösung geht. Die Konzentration gelöster Titanionen beträgt etwa 10^{-35} mol/l.

Bei der Berechnung der Ionenkonzentration ist die Passivierung von Titan zu berücksichtigen.

Da nach den Ergebnissen von Kap. 5.1 die stoffwechselhemmende Wirkung eines Metalls wesentlich von der Konzentration seiner im Substrat vorliegenden Ionen abhängig ist, interessiert der genaue Konzentrationsverlauf während der einzelnen Wachstumsphasen. Die entsprechenden Werte sind für Kupfer, bei dessen Auflösung sich sowohl 1-fach als auch 2-fach geladene Ionen bilden, in Abb. 5.12 dargestellt. Die Löslichkeit bzw. die Ionenkonzentrationen weisen erhebliche Änderungen auf. Hierdurch erklärt sich der bei der Analyse der Wachstumskurven gefundene Effekt, daß das Hemmungsmaß eines metallischen Festkörpers abhängig ist von der Wachstumsphase der Bakterienkultur (Kap. 5.1).

In Abhängigkeit von den unterschiedlichen Konzentrationen gelöster Ionen im Kontakt der einzelnen Metalle mit dem Nährmedium läßt sich eine Reihenfolge der Löslichkeit bestimmen:



Die Reihenfolge der Löslichkeit stimmt überein mit derjenigen der Hydratationskonstanten der Metalle, deren Bedeutung in Kap. 4.1 beschrieben wurde.

Tendenziell zeigt sich eine Übereinstimmung der Löslichkeitsreihe mit den unterschiedlichen Hemmungsstärken der einzelnen Metalle. Eine vollständige Übereinstimmung liegt jedoch nicht vor, da die Löslichkeit zwar einen wesentlichen Faktor der oligodynamischen Wirkungsstärke darstellt, daneben jedoch noch die Stabilität der unterschiedlichen Metall-Protein-Komplexe als weiteres Kriterium zu berücksichtigen ist.

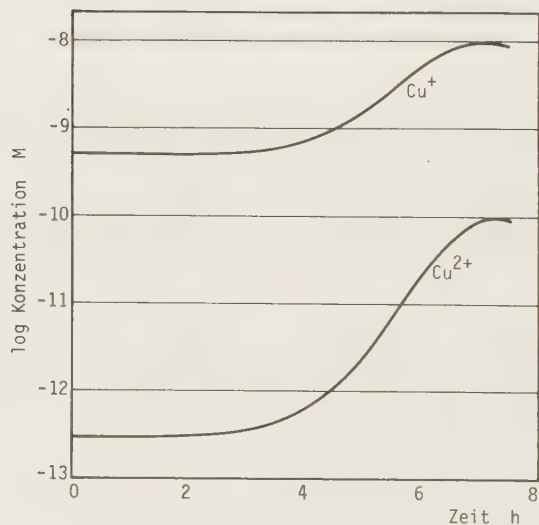
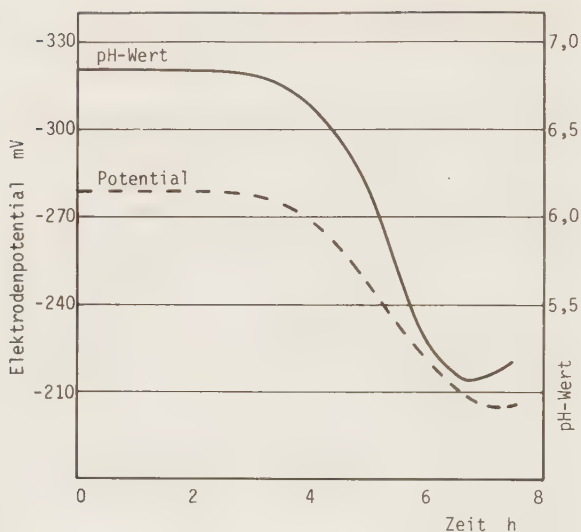


Abb. 5.12 Konzentration gelöster Kupferionen in Abhängigkeit vom pH-Wert und Potential in einer *Salmonella typhi-murium* Kultur. Die Kupferkonzentrationen wurden nach Gl. 2.31 bestimmt.

5.5 Wechselwirkung zwischen pH-Wert, Metabolismus und Metallionenkonzentration

Durch metabolische Säure-Base-Produktion wird eine charakteristische pH-Wert-Änderung des Nährmediums in Abhängigkeit von den Wachstumsphasen der Zellen verursacht.

Die Zugabe von Metallionen bewirkt eine Hemmung des Stoffwechsels und damit - wie aus Abb. 5.13 ersichtlich - eine Verlangsamung der Säure-Base-Produktion.

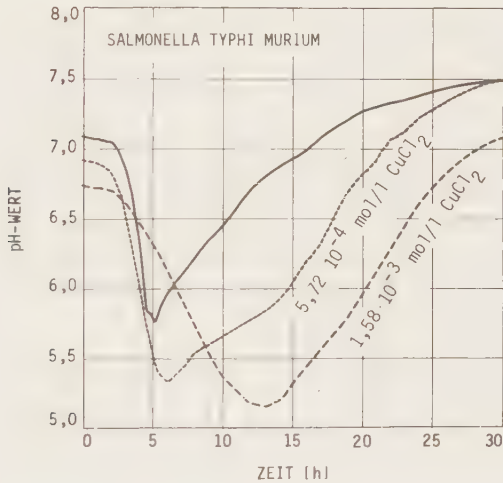


Abb. 5.13 Säure-Base-Produktion von *Salmonella typhi-murium* mit und ohne Kupferionen während der verschiedenen Wachstumsphasen. Substrat: TSB und NaCl

Dies wurde nicht nur bei *Salmonella typhi-murium*, sondern auch an allen anderen untersuchten Gattungen, wie z.B. *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* beobachtet. Die Verlangsamung kann als Maß für die Hemmung herangezogen werden.

Da die Wasserstoffionen an chemischen Reaktionen inner-

halb des Nährsubstrats, wie z.B. der Metallauflösung beteiligt sind, bei der molekularer Wasserstoff entsteht, die Wasserstoffionen also nicht als stabil über einen langen Zeitraum des bakteriellen Wachstums zu betrachten sind, und der beschriebene Effekt bei geringen Ionenkonzentrationen zu relativ ungenauen Ergebnissen führt (vgl. Abb. 5.14), ist die Auswertung der pH-Wert-Kurve zur Bestimmung der Hemmung weniger geeignet als das in Kap. 3.3.1.2 beschriebene photometrische Verfahren.

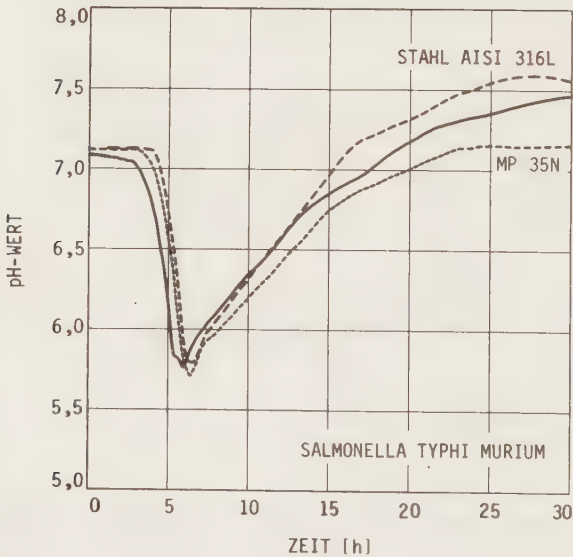


Abb. 5.14 pH-Wertverlauf unter Metalleinfluß während der bakteriellen Wachstumsphasen. Die durchgezogene Kurve zeigt den Verlauf der Säure-Base Produktion von *Salmonella-typhi-murium* ohne Zugabe von Metall in TSB und NaCl.

Neben der direkten Hemmung des bakteriellen Stoffwechsels durch Komplexbildung in der Zelle bzw. Zellwand, tritt zusätzlich ein zweiter Effekt in Erscheinung, wenn dem Nährmedium Metallionen zugegeben werden. Da nicht nur in den Zellen, sondern auch im Substrat Proteine und Aminosäuren enthalten sind, bilden die Metallionen natürlich auch mit diesen Metallkomplexe (vgl. Kap. 5.3):



Durch die hierbei frei werdenden Wasserstoffionen wird der pH-Wert des Nährmediums verringert. Hierdurch wird der mikrobielle Stoffwechsel gehemmt. Dieser Effekt ist bei den in Abb. 5.13 dargestellten Messungen verantwortlich für die unterschiedlichen pH-Werte des Substrats zu Beginn der Messungen. Die für die Versuchsdurchführung erforderliche Kupferionenkonzentration wurde durch Zugabe von gelöstem CuCl_2 hergestellt. Im Moment der Zugabe erfolgte durch die Bildung von Kupferkomplexen eine sofortige Ansäuerung des Mediums.

Bei der in Abb. 5.13 gezeigten Messung wurden die Proben - Stahl AISI 316L und MP 35N - in Form von metallischen Festkörpern zugegeben. Die Auflösung der Metalle erfolgt langsam und in nur geringem Maße und damit ergibt sich ein kleinerer Effekt als bei Zugabe leicht löslicher Salze oder gar bereits gelöster Ionen.

Neben der pH-Wertabsenkung hat die Komplexbildung im Nährmedium eine weitere Konsequenz; sie blockiert wichtige organische Nährstoffe, wie z.B. Cystein und hat damit eine weitere hemmende Auswirkung auf den bakteriellen Stoffwechsel.

Wie bereits dargelegt wurde, beeinflusst der pH-Wert des Nährmediums nicht nur den mikrobiellen Stoffwechsel, sondern auch das Potential und die Löslichkeit eines mit ihm in Kon-

takt stehenden metallischen Festkörpers. In Abhängigkeit von der Zusammensetzung des Mediums können sich jedoch bei gleichen pH-Werten sehr unterschiedliche Potentiale und Löslichkeiten einstellen (Abb. 5.15).

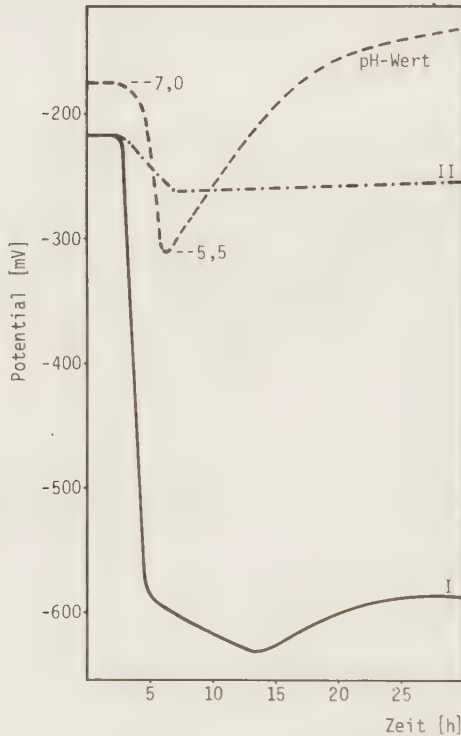


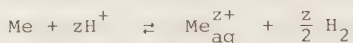
Abb. 5.15 Potential einer Stahlelektrode (AISI 316L) im Kontakt mit einer Kultur von *Salmonella typhimurium* (I) und in einer bakterienfreien Nährlösung, bei der der gleiche pH-Wert wie in der Bakterienkultur durch Zugabe von HCl und NaOH eingestellt wurde (II).

Die genaue Darstellung des Einflusses der stoffwechselbedingten Säure-Base-Produktion auf das Gleichgewichtspotential einer metallischen Elektrode und die daraus resultierenden thermodynamischen Stabilitätsverhältnisse in einem Potential-pH-Diagramm setzen die Berücksichtigung aller in dem betrachteten System möglichen Reaktionen voraus, da im allgemeinen zur Auflösung des Metalls unterschiedliche Reaktionswege möglich sind. Eine derartige Darstellung ist wegen der komplexen Zusammensetzung des Nährmediums und der anfallenden Stoffwechselprodukte der Zellkulturen nicht möglich.

Da im Rahmen der vorliegenden Arbeit die einzelnen Reaktionen bei der Auflösung des Metalls nicht von Bedeutung sind, sondern lediglich interessiert, wie hoch die Konzentration der Metallionen ist, die den Proteinen zur Reaktion zur Verfügung stehen, wurde untersucht, ob es möglich ist, eine einfache Beschreibungsmöglichkeit für die Konzentration der Metallionen in Abhängigkeit vom pH-Wert zu finden, die den hier notwendigen Erfordernissen entspricht. Darüber hinaus sollte es die gewählte Darstellung ermöglichen, ohne weitere Untersuchungen, lediglich mit Hilfe der in den üblichen Nachschlagewerken enthaltenen thermodynamischen Konstanten in Verbindung mit den Ergebnissen von Kap. 4.1 eine genaue Aussage über die oligodynamische Wirkungsstärke eines metallischen Festkörpers machen zu können. Durch Vergleich mit den experimentellen Ergebnissen der Konzentrationsbestimmungen gelöster Metallionen (Kap. 5.6 , AAS) zeigte sich, daß zur Beantwortung der vorliegenden Fragestellung die Bestimmung der Konzentration aus den thermodynamischen Konstanten der Hydratation der Metalle eine ausreichende Genauigkeit bietet.

Die Auflösung und Hydratation der Metallionen im Nährmedium läßt sich mit Hilfe der freien Reaktionsenthalpie bzw. der Stabilitätskonstanten K beschreiben. Hierzu ist

die Reaktion des Metalls mit H^+ - Ionen zu betrachten:



Die dazugehörige Stabilitätskonstante ist:

$$(5.1) \quad K = \frac{[Me_{aq}^{z+}] \cdot [H_2]^{z/2}}{[Me] \cdot [H^+]^z}$$

Unter der Berücksichtigung der Tatsache, daß die Konzentration der H^+ - Ionen durch den pH-Wert des Mediums gegeben ist, erhält man durch Auflösen von Gl. 5.1 nach der Konzentration der hydratisierten Metallionen als grobe Abschätzung für zweiwertige Metallionen:

$$[Me_{aq}^{2+}] = \sqrt[2]{K \cdot 10^{-pH \cdot 2}}$$

Die aus dieser Rechnung hervorgehenden Werte für die Metallionenkonzentration stimmen recht gut überein mit denjenigen, die mittels Potentialmessung bestimmt worden sind (Abb. 5.12). Die Bildungskonstante für die hydratisierten Ionen der einzelnen Metalle kann den üblichen Nachschlagewerken entnommen werden (Weast, 1971).

5.6 Atomabsorptionsspektroskopische Messung

Atomabsorptionsspektroskopische Verfahren sind dazu geeignet, die Konzentration gelöster Metallionen im Substrat zu bestimmen. Der Bakteriensuspension (TSB, NaCl und $1,5 \times 10^8$ Keime/ml) wurde Kupfer als Festkörper zugegeben. Aus dieser Nährlösung wurden nach verschiedenen Zeitintervallen Proben entnommen und der Kupfergehalt bestimmt.

Mit Hilfe der atomabsorptionsspektroskopischen Konzentrationsbestimmung für die Metallionen im Nährsubstrat wurde die Präzision der potentiometrischen und pH-Wert-abhängigen Konzentrationsbestimmung überprüft.

Im Gegensatz zu diesen beiden Verfahren läßt sich mittels AAS nur die Gesamtmenge des in der Probe enthaltenen Kupfers ermitteln, nicht jedoch die Aufteilung in Ionen unterschiedlicher Ladungszahlen, sodaß z.B. nur die Summe der 1- und 2-fach geladenen Kupferionen, sowie die ungeladenen Kupferatome, die sich in Lösung befinden, erfaßt werden kann. Der Vergleich der Meßergebnisse mit den entsprechenden Werten, die aus der potentiometrischen und pH-Wert-Messung gewonnen wurden (Abb. 5.12), zeigen eine recht gute Übereinstimmung (Abweichung < 10%).

5.7 NMR-spektroskopische Analyse des Metall-Protein-Komplexes

Zur Durchführung der Strukturanalyse des Metall-Cystein-komplexes waren die Resonanzpeaks von Cystein und des Cystein-Metall-Komplexes miteinander zu vergleichen. Da die Analyse in Protonenresonanz durchgeführt wurde, mußten alle Änderungen der Protonenkonfiguration des Cysteins bei der Komplexbildung eine entsprechende Änderung des Resonanzspektrums nach sich ziehen. Der Austausch eines Protons mit einem Metallion bedeutet im Spektrum eine Verringerung der Intensität der zu der entsprechen-

den Gruppe gehörenden Resonanzlinie bzw. bei vollständigem Verlust der Protonen ein Verschwinden der Resonanz. So bedeutet beispielsweise die Polarisierung des Cystein, bei der die Carboxylgruppe ihr Proton an die Aminogruppe überträgt, daß die Resonanzlinie der Carboxylgruppe nur sehr wenig ausgeprägt bzw. überhaupt nicht erscheint.

Zur Durchführung der Messung muß das Cystein in Lösung gebracht werden. Die normalerweise benutzte Nährlösung für die Bakterienkulturen (TSB und NaCl) konnte hierzu nicht benutzt werden, da sie als wässrige Lösung im interessierenden Frequenzbereich derart starke und breite Resonanzlinien aufweist, daß das Spektrum des Cystein überdeckt wird und nicht auswertbar ist. Die Herstellung einer entsprechenden Nährlösung mit schwerem Wasser war nicht möglich, sodaß zur Messung ein anderes geeignetes Lösungsmittel benutzt werden mußte. Am besten hierfür eignete sich deuterierte Trifluoressigsäure (CF_3COOH), die die Resonanzlinien des Cystein nicht überdeckt.

Abb. 5.16 zeigt übereinander aufgetragen das Resonanzspektrum des Cystein und seines Kupferkomplexes. Während die Peaks der NH_3^+ -, CH- und $\text{CH}_2\text{-}$ Gruppen bei der Reaktion mit Kupfer von der Komplexbildung unbeeinflusst bleiben, zeigt die Resonanz der SH-Gruppe eine Abschwächung, was im Integral deutlich zum Ausdruck kommt. Dies bedeutet, daß die Zahl der freien Sulfhydrylgruppen reduziert wird durch Anlagerung von Kupferionen. Demzufolge ist nachgewiesen, daß die SH-Gruppe tatsächlich den reaktiven Partner für die Kupferionen bei der Komplexbildung darstellt. Es bestätigt sich, daß die Blockierung der SH-Gruppen verantwortlich ist für die oligodynamische Wirkung der Metalle.

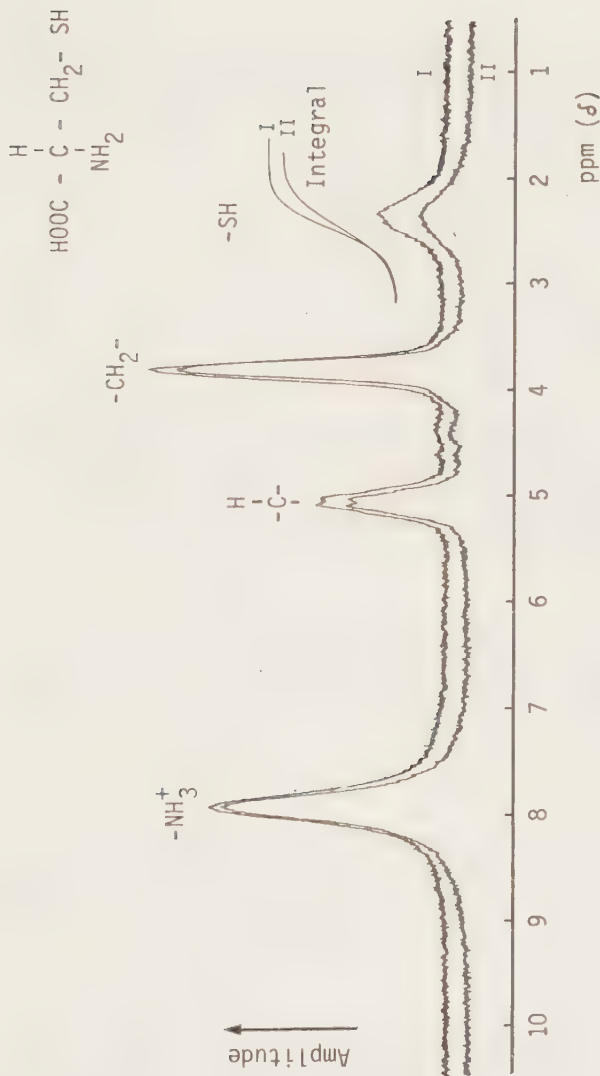


Abb. 5.16 NMR-spektroskopische Analyse des metallorganischen Komplexes Cystein-Kupfer
 I = Cystein, II = Kupfer, Lösungsmittel ist CF₃COOH

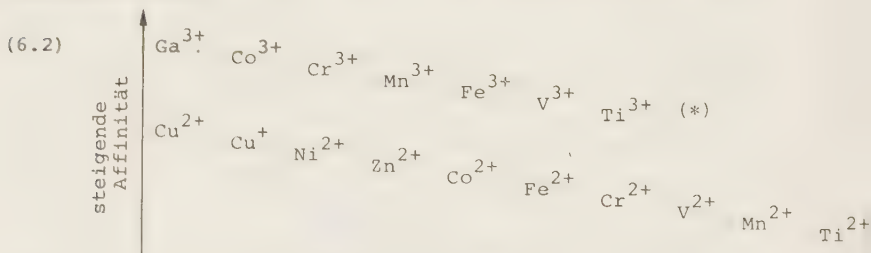
6. Diskussion der Meßergebnisse

Mit Hilfe des in Kap. 2.1.2 entwickelten kinetischen Wachstumsmodells ist es gelungen ein Hemmungsmaß für die Stärke der Oligodynamie anzugeben, das klar Aussagen über das Verhältnis von Wachstums- zu Sterberate zuläßt, und das der Auswertung zugrunde gelegt wurde:

$$(6.1) \quad \epsilon = \left(\frac{w}{s} - 1 \right) \times 1000$$

mit
$$w = \frac{dB_g(t) / dt}{B_{l_0} e^{(w-s)t}} \quad \text{und} \quad s = w - \frac{d}{dt} \ln \frac{dB_g}{dt}$$

In Kap. 4.3 konnte durch die Entwicklung eines Modells für die oligodynamischen Wirkungsmechanismen und dessen experimenteller Bestätigung eine Skala für die Stärke der oligodynamischen Wirkung der verschiedenen metallischen Ionen angegeben werden.



Durch Vergleich der Komplexstabilität einzelner Metall-Protein-Komplexe mit der Hydratationsenthalpie der entsprechenden Metalle ging hervor, daß die Reihenfolge der Affinität der einzelnen Metalle zu den Proteinen die gleiche ist, wie diejenige der aus der Hydratationsenthalpie abgeleiteten Reihe.

Es zeigte sich außerdem, daß die Komplexe Metall-Cystein stabiler sind als alle anderen Aminosäurekomplexe. Es bestätigte sich also die Aussage, daß die Blockierung der SH-

(*) Ti^{3+} liegt im physiologischen pH-Wert-Bereich nicht als freies Ion vor.

Gruppe verantwortlich ist für die oligodynamische Wirkung der Metalle.

Das tatsächliche Hemmungsmaß gelöster Ionen in einer Kultur hängt jedoch neben der Zusammensetzung des biologischen Milieus ganz wesentlich ab von ihrer Konzentration. Da nachgewiesen wurde, daß die hemmende Wirkung der Metalle ausschließlich auf der Wechselwirkung zwischen gelösten Ionen und Zellen beruht, kann die Reihenfolge der Hemmungsstärke nicht ohne Berücksichtigung der Löslichkeit des Metalls im Nährmedium auf Festkörper übertragen werden. Dabei ist zusätzlich zu berücksichtigen, daß bei der Auflösung eines Metalls im Substrat teilweise Ionen unterschiedlicher Ladungszahlen gebildet werden. Durch die Kombination der Ergebnisse der Untersuchungen an Metallionen (6.2) mit den Löslichkeiten der einzelnen Metalle (6.3)



läßt sich eine Reihenfolge für die Wirkungsstärke angeben (6.7).

Nach Gl.4.12 gilt für die Gleichgewichtskonstante der Komplexbildung zwischen Metallionen und organische Liganden für einfach geladene Ionen:

$$(6.4) \quad \frac{[\text{M L}]}{[\text{M}^+][\text{L}]} = K_{\text{ML}}$$

Daraus folgt für das Verhältnis zwischen metallorganischen Komplexen, d.h. blockierten Liganden und ungeschädigten Liganden:

$$(6.5) \quad \frac{[\text{M L}]}{[\text{L}]} = [\text{M}^+] K_{\text{ML}}$$

Mit der in Kap. 4.4.2 angegebenen Gleichung (4.22) zur Bestimmung der Konzentration gelöster Metallionen mit Hilfe der Hydratationskonstanten K_{H} gilt:

$$(6.6) \quad \frac{[M L]}{[L]} = K_{ML} \cdot \frac{K_H \cdot 10^{-pH}}{[H_2]^{1/2}}$$

Zum Vergleich der Hemmungsstärke der unterschiedlichen Metalle unter gleichen Bedingungen ist das Verhältnis der Produkte ν_i der beiden Konstanten, Löslichkeitskonstante K_H und Komplexbildungskonstante K_{ML} (Weast, 1971; Sillen et al, 1964) zu untersuchen:

$$\frac{([ML] / [L])_1}{([ML] / [L])_2} = \frac{\nu_1}{\nu_2} = \frac{K_{M(1)} L \cdot K_{H(1)}}{K_{M(2)} L \cdot K_{H(2)}}$$

Ähnliches gilt für 2-wertige Ionen:

$$\frac{([ML] \cdot [L]^2)_1}{([ML] / [L]^2)_2} = \frac{\nu_1}{\nu_2} = \frac{K_{M(1)} L_2 \cdot K_{H(1)}}{K_{M(2)} L_2 \cdot K_{H(2)}}$$

Tab. 6.1

Gleichgewichtskonstanten für die Komplexbildung zwischen metallischen Festkörpern und Proteinen.

Metall	Cystein	Metall	Methionin	Metall	ADP
	$\log K_{ML} K_H$		$\log K_{ML} K_H$		$\log K_{ML} K_H$
Co ²⁺	25,86	Co ²⁺	16,86	Cu ²⁺	-5,40
Ni ²⁺	27,39	Cu ²⁺	3,45	Ni ²⁺	12,59
Zn ²⁺	43,80	Ni ²⁺	18,39	Zn ²⁺	29,9
Fe ²⁺	26,56	Zn ²⁺	34,10	Co ²⁺	13,16
(Fe ³⁺	33,9)	Fe ²⁺	21,49	Mn ²⁺	43,06

In Abb. 6.1 sind die Hydratationskonstanten K_H und die Gleichgewichtskonstante γ_i für die Komplexbildung zwischen metallischen Festkörpern und Proteinen zum Vergleich gegeneinander aufgetragen. Die Unterschiede in den Komplexstabilitäten zwischen Cystein, Methionin und ADP, wie

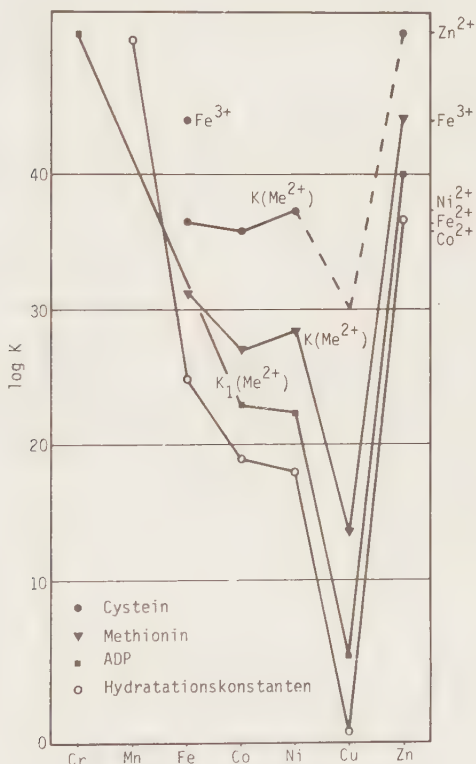
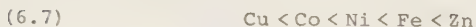


Abb. 6.1 Vergleich zwischen Löslichkeit metallischer Festkörper und ihren Gleichgewichtskonstanten γ bei der Komplexbildung mit Proteinen, bestimmt nach Gl. 6.6.

sie bereits bei der Analyse der hemmenden Wirkung von Metallionen (Abb. 4.6) festgestellt wurde, bleibt erhalten. In der Reihenfolge der Wirkungsstärke der einzelnen Metalle sind jedoch demgegenüber wesentliche Änderungen zu beobachten. Während Kupfer die höchste Komplexstabilität K_{ML} bei den 1- und 2-wertigen Ionen aufweist, d.h. bei gleichen ionalen Konzentrationen die größte Hemmungsstärke besitzt, zeigt sich, daß festes Kupfer wegen seiner äußerst niedrigen Löslichkeit insgesamt in der Reihenfolge der antimikrobiellen Metalle auf den letzten Platz zu setzen ist. Während das 3-wertige Eisen und Kobalt die höchsten Komplexstabilitätskonstanten der metallorganischen Komplexe aufweisen - von den betrachteten Metallen sind es die einzigen Metalle, die die Wertigkeit drei annehmen können - fallen auch sie im Vergleich der Wirkungsstärke hinter die vergleichsweise stark löslichen Metalle Chrom und Zink zurück. Liegen die Komplexbildungskonstanten für ein Protein mit den Metallionen sehr nahe beieinander, wie dies bei ADP zutrifft, so entspricht der Verlauf der Hemmungsstärke völlig demjenigen der Löslichkeitskurve. Für die Beurteilung der oligodynamischen Wirkungsstärke der einzelnen Metalle ist jedoch ihre Wechselwirkung mit dem stärksten Liganden, d.h. Cystein ausschlaggebend. Demzufolge ergibt sich unter Berücksichtigung der Ionen unterschiedlicher Ladungszahlen für die untersuchten Metalle folgende Reihenfolge:



Diese Reihenfolge gilt natürlich nur, solange es sich um die reinen metallischen Festkörper handelt. In der Praxis können sich durch abweichende Löslichkeitskonstanten, die auf die Oberflächenbeschaffenheit, wie z.B. Oxydation zurückzuführen sind, aber auch bei anderen Lösungsmitteln (Substraten) gänzlich andere Werte für die oligodynamische Wirkungsstärke ergeben. Als Beispiel sei Titan erwähnt, dessen im sauren Substrat ($\text{pH} < 5$) gelöste Ionen nach Tab. 5.3 eine starke abtötende Wirkung aufweisen, dessen Festkörper aber wegen der stets vorhandenen Passivschicht (TiO_2) der Oberfläche keinerlei hemmenden Effekt zeigt.

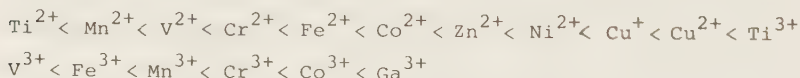
7. Zusammenfassung

Die systematische Erforschung der oligodynamischen Wirkung und die Aufklärung der charakteristischen Wirkungsmechanismen erforderte zunächst die genaue Untersuchung der phänomenologischen Effekte. Zunächst wurde zur quantitativen Erfassung des bakteriellen Wachstums ein photometrisches Meßverfahren entwickelt, mit dem sich die Zahl der Mikroorganismen der Kulturen während der verschiedenen Wachstumsphasen kontinuierlich registrieren läßt. Die Analyse von Wachstum und Stoffwechsel unterschiedlicher Bakterien- und Zellkulturen ermöglicht es, ein allgemeingültiges kinetisches Wachstumsmodell aufzustellen. Im Gegensatz zu bisherigen Modellen wird erstmals nicht nur die Zellteilung bzw. das Wachstum berücksichtigt, sondern auch der Einfluß der absterbenden Zellen auf die gesamte Population. Dieses kinetische Wachstumsmodell erlaubt die analytische Beschreibung der charakteristischen Vermehrungsparameter. Mittels photometrischer Zellzahlbestimmung können durch Separation nach Wachstums- und Absterbebeschwindigkeit neben qualitativen auch quantitative Aussagen über das Wachstumsverhalten gewonnen werden. Wichtigster Vorteil dieser Beschreibung von Wachstum und Stoffwechsel ist, daß ein genaues und zuverlässiges Maß für die hemmende Wirkung der Metalle ableitbar ist. Dieses gestattet es, Hemmfaktoren, die bei unterschiedlichen Versuchsbedingungen gemessen wurden, miteinander zu vergleichen.

Als praktisches Ergebnis konnte eine Skala der bakteriziden Wirkung und der Gewebeverträglichkeit der untersuchten Metalle bestimmt werden. Die Reihenfolge der einzelnen Metalle ist in beiden Fällen gleich. Wegen der unterschiedlichen Zusammensetzung der Nährmedien und Abweichungen im Stoffwechsel zwischen Gewebezellen und Bakterien treten jedoch Unterschiede in der Stärke des hemmenden Einflusses auf. Dies bedeutet, daß ein antimikrobiell wirkendes Metall gewebeunverträglich ist und umgekehrt. Metalle können nicht gleichzeitig das Wachstum von Bakterien hemmen und gewebeverträglich sein.

Wesentlich für die Aufklärung der oligodynamischen Wirkungsmechanismen war es, zu untersuchen, ob - wie bisher meist vermutet - eine direkte Wechselwirkung zwischen den Organismen und dem metallischen Festkörper für deren toxische Wirkung von Bedeutung ist, und ob möglicherweise gar bakterielle Korrosion wesentlicher Bestandteil der Wirkungsmechanismen ist. Die durchgeführten Untersuchungen zeigten eindeutig, daß eine direkte Wechselwirkung zwischen metallischem Festkörper und Zelle nicht verantwortlich ist für die Blockierung des Stoffwechsels. Maßgeblich ist nur die Reaktion der zellulären Aminosäuren und Proteine mit den im Substrat gelösten Metallionen.

Die experimentellen Erkenntnisse bestätigen, - qualitativ wie quantitativ - daß die oligodynamische Wirkung der Metalle auf die Bildung von Metall-Amino-Komplexe zurückzuführen ist. Bildung und Stabilität der metallorganischen Komplexe lassen sich auf der Basis der Ligandenfeldtheorie beschreiben. Maßgeblich für die Möglichkeit der Komplexbildung zwischen einem organischen Liganden und einem Metallion, sowie für die Stabilität des entstehenden Komplexes ist die mit der Komplexbildung verknüpfte Änderung der freien Enthalpie. Für die Affinität der Übergangsmetalle zu verschiedenen Aminosäuren, ADP, Cystein und Methionin, leitet sich damit folgende experimentell bestätigte Reihe ab:



Als weiteres wesentliches Ergebnis geht aus der Analyse der Komplexstabilitäten hervor, daß die Metall-Affinität der Sulfhydrylgruppen der Aminosäuren und Proteinen stärker ist als diejenige der übrigen Gruppen (Amino-, Carboxylgruppen). Dies wurde durch NMR-spektroskopische Analyse der Reaktionsprodukte überprüft und es bestätigte sich, daß die Metall-Affinität der SH-Gruppe verantwortlich ist für die Bildung metallorganischer Komplexe und damit für die Denaturierung des Proteins.

Die experimentelle Überprüfung des Wechselwirkungsmodells hinsichtlich der Konzentrationsabhängigkeit der oligodynamischen Wirkung der Metalle setzte voraus, daß nicht nur die Gesamtkonzentration der im Substrat gelösten Metallionen bestimmt, sondern auch die Separation der Ionen nach ihrer unterschiedlichen Ladungszahl durchgeführt wurde. Hierzu wurde die Konzentration mittels thermodynamischer Berechnung aus potentiometrischen Messungen ermittelt, ein Verfahren, das bisher noch nicht zur Anwendung kam. Die daraus berechneten Ergebnisse und die aus dem pH-Wert-Verlauf ermittelten Konzentrationsbestimmungen wurden mittels AAS überprüft, die jedoch keine Aufspaltung in Ionen unterschiedlicher Ladungszahlen zuläßt.

Da die Metalle 'ausnahmslos zur Bildung von Protein-Komplexen neigen, hängt die Frage, ob ein metallischer Festkörper abtötend wirkt oder nicht ausschließlich davon ab, ob die Konzentration der in Lösung gehenden Ionen ausreicht für die hemmende Wirkung. Die erforderliche Konzentration, die aus den Experimenten ermittelt wurde, liegt bei 10^6 Metallionen pro Zelle. Diese Zahl weist jedoch starke Schwankungen auf, da sie abhängig ist von der Anzahl der organischen Bausteine der Zellen.

Die einzelnen Metalle unterscheiden sich zwar hinsichtlich der Stärke ihres hemmenden Einflusses, da sie aber ausnahmslos antimikrobiell wirken bzw. toxisch sind, wird diese Tatsache überdeckt von den großen Unterschieden, die sich in der Löslichkeit der einzelnen Metalle zeigen. Für die Löslichkeit der einzelnen Metalle gilt folgende Reihe:



Unter Berücksichtigung der Wechselwirkung mit den stärksten Liganden, Cystein, ergibt sich für feste Metalle durch Kombination der Löslichkeit metallischer Festkörper mit der Gleichgewichtskonstanten K bei der Komplexbildung folgende Reihe:



Die Ergebnisse der experimentellen Untersuchungen der oligodynamischen Wirksamkeiten der Metalle und die Angabe der Wirkungsmechanismen erlauben künftig die systematische Entwicklung keimtötender oder gewebeverträglicher Materialien.

8. Literatur

- Becker, R.: Theorie der Wärme. Springer-Verlag (Berlin, Heidelberg, New York 1966)
- Berger, U.: Sterilisation, Desinfektion und Hygiene in der zahnärztlichen Praxis. Urban & Schwarzenberg (München, Berlin 1950)
- Bergmann, L., Schäfer, Cl.: Lehrbuch der Experimentalphysik. Band IV, Walter de Gruyter (Berlin, New York 1981)
- Bertarelli, E.: Über das Vorkommen schwerer Metalle in irdischen Geschirren und metallischen Gefäßen entstammenden Nahrungsölen. Zentralblatt für Bakteriologie, Mikrobiologie und Hygiene I/B, Band 47/115 (1903)
- Borneff, U.: Metalle und Metalloide im Wasser. Zentralblatt für Bakteriologie, Mikrobiologie und Hygiene I/B, Band 158/524 (1973)
- Buddecke, E.: Grundriß der Biochemie. Walter de Gruyter (Berlin, New York 1977)
- Bundy, K.J., Butler, M.F., Hochmann, R.F.: An investigation of the bacteriostatic properties of pure metals. Journal of Biomedical Materials Research, Vol.14, No.5, 653-663 (1980)
- Christen H.R.: Grundlagen der allgemeinen und anorganischen Chemie. Salle Verlag (Frankfurt am Main 1969)
- Cordes, J.F.: Allgemeine Chemie 2: Struktur und Bindung. Verlag Chemie-Physik Verlag (Weinheim 1978)
- Coulson, C.A.: Die chemische Bindung. S.Hirzel-Verlag (Stuttgart 1969)
- D'Ans Lax: Taschenbuch für Chemiker und Physiker. Band I, Springer-Verlag (Berlin, Heidelberg, New York 1967)
- D'Ans Lax: Taschenbuch für Chemiker und Physiker. Band II, Springer-Verlag (Berlin, Göttingen, Heidelberg 1964)
- D'Ans Lax: Taschenbuch für Chemiker und Physiker. Band III, Springer-Verlag (Berlin, Heidelberg, New York 1970)
- Einstmann, E.: Zur oligodynamischen Wirkung einiger neuer Baometalle. Zentralblatt für Bakteriologie, Mikrobiologie und Hygiene I/B, Band 143/634 (1959)

- Gutmann, H.: Über die oligodynamische Trinkwasserbereitung mittels verschiedener Katadynverfahren. Z.Hyg. Infekt.-Kr. 116 (1935), 421-432
- Hamann, C.H., Vielstich, W.: Elektrochemie I: Leitfähigkeit, Potentiale, Phasengrenzen. Verlag Chemie-Physik Verlag (Weinheim (1975)
- Hamann, C.H., Vielstich, W.: Elektrochemie II: Elektrodenprozesse, angewandte Elektrochemie. Verlag Chemie-Physik Verlag (Weinheim 1981)
- Hause, L.L., Komorowski, R.A.: Electrode and Electrolyte Impedance in the Detection of Bacterial Growth. IEEE Transactions on Biomedical Engineering, Vol. BME-28, No.5 (1981)
- Hoffmann, S.: Bakteriologische und hygienische Erfahrungen bei Desinfektionsversuchen vermittels des Elektrokata-dyn-Verfahrens. Arch.Hyg. 120 (1938) 147
- Holleman, A.F., Wiberg, E.: Lehrbuch der anorganischen Chemie Walter de Gruyter (Berlin, New York 1976)
- Jacherts, D.B.: Elemente der Bakterienphysiologie. Akademische Verlagsgesellschaft (Frankfurt am Main 1964)
- Krüger, E., Frenkel, G., Havers, L., Lange, D.E.: Operationslehre für Zahnärzte. Buch- und Zeitschriftenverlag: Die Quintessenz (Berlin, Chicago, Rio de Janeiro, Tokio 1979)
- Lautenschläger, C.L., Schmidt, H.: Sterilisationsmethoden für die pharmatzeutische und ärztliche Praxis. Georg Thieme Verlag (Stuttgart 1954)
- Lawrence, C.A., Seymour, S.B.: Disinfection, Sterilisation and Preservation. Lea & Febiger (Philadelphia 1968)
- Lieb, F.: Verwendung der oligodynamischen Wirkung des Silbers in der Hygiene des Wassers. Zentralblatt für Bakteriologie, Mikrobiologie und Hygiene I/B, Band 119/92 (1938)
- Mc Dade, J.J., Hall, L.B.: An experimental Method to measure the Influence of enviromental Factors on the Vitability and the Pathogenicity of Staphylococcus aureus. American Journal of Hygiene (Baltimore) 77, 98 (1963)

- Mc Dade, J.J., Hall, L.B.: Survival of *Staphylococcus aureus* in the Environment I/II. American Journal of Hygiene (Baltimore) 78, 330 (1963) bzw. 80, 184 (1964)
- Mc Dade, J.J., Hall, L.B.: Survival of gramnegative Bacteria in the Environment. American Journal of Hygiene (Baltimore) 80, 192 (1964)
- Miller, W.: Verh. dtsch odont. Ges 1(1889) Heft 1; zit nach: W. Zimmermann: Oligodynamische Silberwirkung. I. Über der Wirkungsmechanismus. Z.Hyg.Infekt.-Kr. 135 (1952), 403-413
- Müller, R.: Medizinische Mikrobiologie. Urban & Schwarzenberg (München, Berlin 1950)
- Nagel, J.: Analyse bioelektrischer Potentiale in der Perinatologie. Offset Fotodruck Hogl, (Erlangen 1979)
- Nägeli, C.v.: Über die oligodynamischen Erscheinungen an lebenden Zellen. Neue Denkschr. Allg.Schweiz. Ges. Naturwiss. 33 (1893) I
- Nakamuva, M.: The survival of *Shigella sonnei* on cotton, glass, wood, paper and metal at various temperatures. Journal of Hygiene (Cambridge) 60, 35 (1962)
- Netter, H.: Theoretische Biochemie. Springer-Verlag (Berlin, Göttingen, Heidelberg 1959)
- Otte, H.J., Brandis, H.: Lehrbuch der medizinischen Mikrobiologie. Gustav Fischer Verlag (Stuttgart, New York 1978)
- Ottensooser, F.: Wirksamkeit des Silberoxyds und des Katadynsilbers. Zentralblatt für Bakteriologie, Mikrobiologie und Hygiene I/B, Band 113/258 (1935)
- Paul, J.: Cell & Tissue Culture. Churchill Livingstone (Edinburgh, London, New York 1975)
- Reddish, G.F.: Antiseptics, Disinfectants, Fungicides and Chemical and Physical Aterilisation.
- Rehm, H.J.: Industrielle Mikrobiologie. Springer-Verlag (Berlin, Heidelberg, New York 1980)
- Reich, R.: Thermodynamik, Grundlagen und Anwendungen in der Allgemeinen Chemie. Verlag Chemie Physik Verlag (Weinheim 1978)
- Reif, F.: Physikalische Statistik und Physik der Wärme. Walter de Gruyter (Berlin, New York 1976)
- Rein, H., Schneider, M.: Physiologie des Menschen. Springer-Verlag (Berlin, Heidelberg, New York 1971)

- Reploh, H., Otte, H.J.: Lehrbuch der medizinischen Mikrobiologie. Gustav Fischer Verlag (Stuttgart 1965)
- Rickert, H.: Einführung in die Elektrochemie fester Stoffe. Springer-Verlag (Berlin, Heidelberg, New York 1973)
- Ruf, H.: Oligodynamische Wirkung von Luftschichten. Zentralblatt für Bakteriologie, Mikrobiologie und Hygiene I/B, Band 112/333 (1934)
- Schmidt, J., Naumann, G., Horsch, W.: Sterilisation, Desinfektion und Entwesung. VEB Georg Thieme Verlag (Leipzig 1968)
- Schuster, P., Schaldach, M., Gräf, W.: Die oligodynamische Wirkung von metallischen Werkstoffen chirurgischer Instrumente. 15 Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Bio-medicinische Technik (Stuttgart 1981)
- Sillen, L.G., Martell, A.E.: Stability Constants of Metal-Ion Complexes. The Chemical Society, Burlington House, W.1 (London 1964)
- Stanier, R.Y., Adelberg, e.A., Ingraham, J.L.: General Microbiology. Prentice Hall Inc (Hong Kong 1980)
- Stârka, J.: Physiologie und Biochemie der Mikroorganismen. Gustav Fischer Verlag (Stuttgart 1968)
- Steuer, W., Dettinger, U.L.: Leitfaden der Desinfektion, Sterilisation und Entweseung. Gustav Fischer Verlag (Stuttgart 1976)
- Suhr, H.: Anwendungen der KMR in der organischen Chemie. Springer-Verlag (Berlin, Heidelberg, New York 1965)
- Sykes, G.: Disinfection and Sterilisation. E & F.N. Spon LTD (London 1958)
- Thiele, H., Wolf, K.: Über die bakterienschädigenden Einwirkungen der Metalle. Zentralblatt für Bakteriologie, Mikrobiologie und Hygiene I/B, Band 34/43 (1899)
- Thimann, K.V.: Das Leben der Bakterien. VEB Gustav Fischer Verlag (Stuttgart 1964)
- Thull, R.: Implantatwerkstoffe für die Endoprothetik. Fachverlag Schiel & Schön GmbH (Berlin 1978)
- Uglowa, T.: Einschätzung der mittels oligodynamischer Silberwirkung hergestellten Typhus Vaccine. Zentralblatt für Bakteriologie, Mikrobiologie und Hygiene I/B, Band 117/144 (1937)
- Vetter, K.J.: Elektrochemische Kinetik. Springer-Verlag (Berlin, Göttingen, Heidelberg 1961)

- Wallhäuser, K.H., Schmidt, H.: Sterilisation, Desinfektion, Konservierung, Chemotherapie, Verfahren, Wirkstoffe, Prüfungsmethoden. Georg Thieme Verlag (Stuttgart 1967)
- Weast, R.C.: Handbook of Chemistry and Physics. The Chemical Rubber Co (Cleveland 1971)
- Welz, B.: Atomabsorptionsspektroskopie. Verlag Chemie (Weinheim 1975)
- Weuffen, W.: Handbuch der Desinfektion und Sterilisation.
Band I, VEB Verlag Volk und Gesundheit (Berlin 1972)
- Weuffen, W.: Handbuch der Desinfektion und Sterilisation.
Band III, VEB Verlag Volk und Gesundheit (Berlin 1974)
- Wiesmann, E.: Medizinische Mikrobiologie. Georg Thieme Verlag (Stuttgart 1978)
- Woratz, H., Thofern, E.: Beitrag zum Wirkungsmechanismus der Oligodynamie. Zentralblatt für Bakteriologie I, Originale 163 (1955)
- Zimmermann, W.: Oligodynamische Silberwirkung, I. Über den Wirkungsmechanismus. Z. Hyg. Infekt.-Kr 135, 403-413 (1952)
- Zimmermann, W.: Wasserentseuchung durch oligodynamische Silberwirkung. Zentralblatt für Bakteriologie I Originale 160 (1953), 70-73

Herrn Professor Dr. med. Dr. med.dent. W. Gräf danke ich für die Überlassung des Themas sowie die Förderung dieser Arbeit.

Herrn Professor Dr.-Ing.M. Schaldach möchte ich dafür danken, daß ich einige Experimente an seinem Institut durchführen durfte.

Herrn Professor Dr. rer. nat.G. Ritter danke ich für die Übernahme des Gutachtens.

Für wertvolle Anregungen und Diskussionen danke ich Herrn Dr. rer. nat.J. Nagel.

Herrn Professor Dr.-Ing.G. Müller danke ich für die Überlassung eines Mikroskops.

L E B E N S L A U F

- 17.11.1954 in Bayreuth als Tochter des Obermedizinalrates Dr. Oskar Schuster (1965 am Kriegsleiden gestorben) und seiner Ehefrau Eva, geb. Igel, geboren.
- 1961-1965 Volksschule in Bayreuth
- 1965-1974 Markgräfin Wilhelmine Gymnasium in Bayreuth
1974 Reifeprüfung
- 1974-1975 Jurastudium in Würzburg
- 1975-1980 Studium der Physik und Mathematik in Erlangen
1980 Wissenschaftliche Prüfung für das Lehramt an Gymnasien
Thema der Zulassungsarbeit: Zur Bestimmung des Debye-Waller-Faktors von Eisen aus Mößbauerspektren magnetisierter Eisenfolien
- 1980-1982 Promotionsstudium in Erlangen
zeitweise Beschäftigung im Institut für Umwelt-
hygiene und Präventivmedizin als wissenschaftliche Hilfskraft

